



UNICAMP

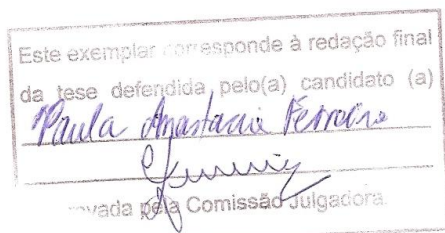


## UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Instituto de Biologia

Paula Anastácia Ferreira

### MODULAÇÃO DE VIAS DE SINALIZAÇÃO PARA INDUÇÃO DE MORTE DE CÉLULAS LEUCÊMICAS



Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutor em Biologia Funcional e Molecular, na área de Bioquímica.

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Carmen Veríssima Ferreira

**Campinas, 2010**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

**F413m**

Ferreira, Paula Anastácia

Modulação de vias de sinalização para indução de morte de células leucêmicas / Paula Anastácia Ferreira. – Campinas, SP: [s.n.], 2010.

Orientadora: Carmen Veríssima Ferreira.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Apoptose. 2. Calixarenos. 3. Fosfatase. 4. Leucemia. I. Ferreira, Carmen Veríssima. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

**Título em inglês:** Modulation of signaling pathways for death induction of leukemia cells.

**Palavras-chave em inglês:** Apoptosis; Calixarenes; Phosphatase; Leukemia.

**Área de concentração:** Bioquímica.

**Titulação:** Doutor em Biologia Funcional e Molecular.

**Banca examinadora:** Carmen Veríssima Ferreira, Eneida de Paula, Cláudio Chrysostomo Werneck, Elizeu Antunes dos Santos, Antônio Galina Filho.


**Data da defesa:** 05/07/2010.

**Programa de Pós-Graduação:** Biologia Funcional e Molecular.

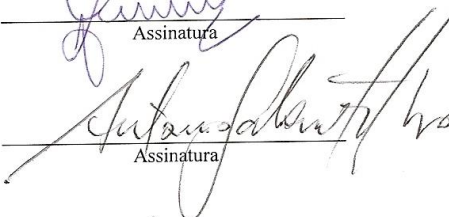
Campinas, 05 de Julho de 2010

**BANCA EXAMINADORA**

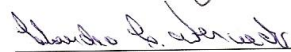
Profª. Dra. Carmen Veríssima Ferreira (Orientadora)

  
Assinatura

Prof. Dr. Antônio Galina Filho

  
Assinatura

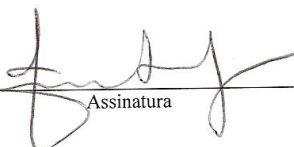
Prof. Dr. Cláudio Chrysostomo Werneck

  
Assinatura

Prof. Dr. Eliseu Antunes dos Santos

  
Assinatura

Profª. Dra. Eneida de Paula

  
Assinatura

Prof. Dr. Antônio Carlos Boschero

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Prof. Dr. Willian Fernando Zambuzzi

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Prof. Dr. Rodrigo Ramos Catharino

\_\_\_\_\_  
Assinatura

*Saibamos agradecer as dádivas que o senhor nos concede cada dia:*

- *A largueza da vida;*
- *O ar abundante;*
- *A graça da locomoção;*
- *A faculdade do raciocínio;*
- *A fulguração da idéia;*
- *A alegria de ver;*
- *O prazer de ouvir;*
- *O tesouro da palavra;*
- *O dom de aprender;*
- *A conversação do amigo;*
- *O aconchego do amigo;*
- *O contentamento de construir para o futuro;*
- *A renovação das próprias forças...*

*Nada existe insignificante na estrada que percorremos.*

*Todas as concessões do Pai Celeste são preciosas no campo de nossa vida.*

*Utilizando, pois, o patrimônio que o senhor nos empresta, no serviço incessante ao bem, aprendamos a AGRADECER.*

*Autor desconhecido.*

*Obrigada pela vida!*

*Eu dedico essa tese a meu pai in memoriam (meu avô Jorge) e a minha avó Maria (in memoriam), inspiração da minha vida, tudo que sou agradeço aos ensinamentos deles. (Eu amarei vocês eternamente!).*

*E a minha adorada mãe Rita, a pessoa mais importante da minha vida. E toda minha família (minha irmã Patrícia, meu cunhado Walker, meus sobrinhos Amanda e Ícaro, meu afilhado Rian, Larissa, tia Lena, tia Eridam, tia Edineide, tio João, Marilene, meus primos e à todos, sem exceção.*

*Obrigada por existirem!*

## **AGRADECIMENTOS**

*À Deus que é tudo na minha vida. “Tudo é do pai, toda honra e toda glória, é dele a vitória alcançada em minha vida”. Muito obrigada por esse momento tão importante na minha vida.*

*À profª Drª. Carmen Veríssima Ferreira, minha orientadora, a quem eu respeito e admiro muito, pela sua competência e dedicação a pesquisa (trabalha muito), sempre aberta, sempre vendo o lado positivo de tudo, muito obrigada pela honra de ter me aceito em seu laboratório e por todo apoio no decorrer do doutorado e principalmente nessa fase final o seu apoio foi fundamental. Muito obrigada por tudo. Eu cresci muito profissionalmente. Muito obrigada.*

*Ao Prof. Dr. Ângelo de Fátima, muito obrigada por tudo, principalmente por sua atenção quando solicitada, muito obrigada.*

*À minha banca de qualificação: Drª. Eneida de Paula, Dr. Willian F. Zambuzzi, Dr. José Camilo, Drª. Denise Vaz de Macedo, Dr. Cláudio Werneck. Obrigada pelas valiosas sugestões.*

*À Profª Drª. Eneida de Paula, a quem admiro muito, como pessoa e como uma excelente professora, obrigada por ter me dado a honra de fazer o Programa de Estágio Docente (PED), foi de fundamental importância para minha formação profissional e obrigada a toda a equipe do PED (a Karen, que se tornou uma grande amiga, a Bianca, e ao prof. Dr. Cláudio C. Werneck). Obrigada pelas reuniões semanais e aulas no curso de Enfermagem 2008!*

*Ao prof. Dr. Hiroshi Aoyama, uma pessoa encantadora, só tenho agradecer pelo apoio e por manter as portas abertas do seu laboratório. Meu muito obrigada por sua atenção e a sua amizade!*

*Ao prof. Dr. Antonio Carlos Boschero, obrigada por sempre disponibilizar seu laboratório, sua atenção prestada e conversas agradáveis. Muito obrigada por tudo.*

*À profª Drª. Gisele Zenker Justo, uma pessoa que admiro pela competência.*

*À profª Drª. Denise Vaz de Macedo, obrigada pela atenção e por disponibilizar o ImageScanner.*

*Ao prof. Dr. Tomomasa Yano, obrigada pela atenção e por disponibilizar o “shake” para as membranas de stripping e a técnica Estela e ao Luciano pela ajuda prestada.*

*À prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Fernanda R. Gadelha, obrigada pela atenção e por disponibilizar alguns equipamentos do seu laboratório.*

*Ao prof. Dr. Alexandre M Cavagis, obrigada pelo apoio.*

*Ao Bispo, um anjo que precisava passar na minha vida no início desse doutorado, para me oferecer o suporte que ele me ofereceu. Um amigo, o irmão que eu não tive, estarei sempre torcendo por você! Agradeço a Deus por ter conhecido alguém como você. Muito obrigada por tudo. Saudades.*

*Às técnicas do laboratório, Denise e Cláudia. Denise, obrigada pelo carinho constante desde que entrei no laboratório, pelas conversas, pelos conselhos, como se fosse de uma mãe para uma filha. Você é muito especial para mim e te admiro demais, você é linda por dentro e por fora. Deus te colocou no meu caminho, para me oferecer forças para enfrentar muitos obstáculos. Cláudia, obrigada pelo carinho e conversas que me ajudaram muito.*

*À Roberta (Lab. Enzimologia), muito obrigada pela amizade e pelos experimentos que fez na Universidade de Groningen-Holanda, que foram fundamentais para o término desta tese.*

*À Erika (Lab. Enzimologia), obrigada pela amizade e atenção prestada sempre, principalmente na fase final da minha tese. MUITÍSSIMO obrigada. Conte comigo.*

*À Ana (Labex), Kiko (LabdaT) Juliana (lab. Aula Prática), Márcio, Maribel e Sr<sup>a</sup> Cida (lab. Biomenbranas), Neto (lab. Proteômica) e Paulinho (Laquip), meu muito obrigada à todos pela atenção prestada.*

*Luciana (Lab. Enzimologia), minha linda, dotada de um astral sublime, obrigada pela sua amizade.*

*À Marina, secretária do departamento de Bioquímica, obrigada por todo apoio sempre que precisei.*

*Aos secretários da pós-graduação, Andréia, Sílvia e Rafael, obrigada por todo apoio nos momentos que precisei.*

*Ao Thiago, Priscila, Flávia e a Camila do Departamento de Fisiologia, agradeço imensamente a atenção de vocês.*

*Ao José, obrigada pelo apoio na parte estatística*

*À Rose (IQ), obrigada pelo apoio nos experimentos iniciais.*

*Ao Ferreira (manutenção) e Rosângela (limpeza), obrigada pela atenção e trabalho de vocês.*

*Ao pessoal da República e todos que passaram por lá (Willian, Rodrigo, Alex, Antônio, Marina, Alexandre, Evaristo, Gêssica), com vocês passei momentos que guardarei para sempre (quem sabe, para contar para os meus filhos). Obrigada pela amizade, aprendi muito, uma boa sorte no destino de todos vocês. Gosto muito de vocês.*

*Ao Thiago, Eduardo, Pablo, Denise (irmã da Daisy), Rafael e Cleiton, obrigada pela atenção.*

*À Elaine, astral maravilhoso, amiga obrigada por tudo.*

*À Júlia e ao Halley, um casal que torço imensamente pela felicidade, muito obrigada pelo carinho apoio e atenção sempre. Adoro vocês.*

*Ao Renato, instrutor da academia, quero te dizer muitíssimo obrigada por tudo, pela paciência, insistência de montar várias fichas e por todos os conselhos, conversas, risadas e muita força. Você e o Fernando Catanho (Labex) profissionais excelentes sempre tentando me mostrar o quanto é importante ter uma vida saudável. Obrigada principalmente por essa amizade construída nesses últimos anos. Eu gosto muito de vocês.*

*Valéria, obrigada pela sua amizade e companhia muito agradável.*

*Vanessa e Carol, amigas obrigada pela companhia. Espero que a nossa amizade perdure, estarei torcendo pela felicidade de vocês. Obrigada por todos os momentos.*

*Rosane, obrigada por todo apoio amiga, conversas, amizade, competência profissional. Acredite em você! Espero um dia poder retribuir toda ajuda prestada e conte comigo. Muito obrigada.*

*Aos estagiários do lab. de Transdução de Sinal e Bioensaíos *in vitro*, Rodolpho, Natália, Tamira, Natália Prado e Guilherme, obrigada pela amizade.*

*Aos amigos do Labex, Paulo, Fernando, Danilo, Carol, Eduarda, Rodrigo, Lazáro, Fernanda e Madla, obrigada pelas conversas e atenção.*

*Aos meus amigos maravilhosos de Natal: Cecília, Karlinha, Valquíria, Gerane, Claudinha, Inailson, Valéria, Marília, Cecília, Luciana, Jucelino, Lucina Duarte, Luciana Sílvia, Eliane, prof. Luiz, prof. Hugo, Fábio e Adriana. Com todos passei momentos inesquecíveis. Saudades.*



*Aos meus amigos de Campinas, Antônio, Alex, Samara, Martinha, Elson, Fabiano, Neto, Márcia (esposa do Willian), André, Daniel, Marcela, Gabi, Malú, Mariane, Maurício, Willian, Priscila, Ana Paula, Felipe, Léo, Fernando, Lucas, Rose, Tâmara, Lú, Bruno, Lázinha, Odair, Madalena, Elías, Neusa, Ivan, Maria, aos pais do Antônio e aos pais da Vanessa. Obrigada pelo carinho.*

*À todos os colegas do lab. de Transdução de Sinal e Bioensaios *in vitro* e do lab. de Enzimologia: Denise, Cláudia, Willian, Ana Carolina, Mika, Claudinha, Rodrigo, Antônio, Daisy, Renato, Sarah, Ana Laura, Luísa, Júlia, Tamira, Naty, Thelma, Juliana, Juliana Miyabara, Luciana, Erika, Betinha, Luli, Marilena, Camila, Guilherme, Nataly e Miriam. Obrigada por tudo.*

*Ao CNPq, pela oportunidade do desenvolvimento deste projeto.*

*À UNICAMP, uma Universidade Brilhante que me ajudou muito a crescer profissionalmente.*

*Meus sinceros agradecimentos a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão deste trabalho. Muito obrigada!*

*Esta pesquisa foi viabilizada com recursos das seguintes Instituições:*



Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP



Conselho Nacional de desenvolvimento Científico e Tecnológico



Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo  
FAPESP



University Medical Center Groningen, University of Groningen,  
Groningen, The Netherlands.

# SUMÁRIO

RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
LISTA DE FIGURAS .....	xv
LISTA DE TABELA.....	xvii
LISTA DE ABREVIATURA .....	xviii
1. INTRODUÇÃO .....	3
1.1. CÂNCER X DADOS EPIDEMIOLÓGICOS .....	3
1.2. LEUCEMIA.....	5
1.2.1 Vias de sinalização que estão ativadas na CML .....	5
1.3. TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO DA LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA....	6
1.4. RESISTÊNCIA A MÚLTIPLAS DROGAS (MDR) .....	8
1.5. TRANSPORTADORES ABC.....	9
1.6. MODELOS CELULARES UTILIZADOS NESTE TRABALHO .....	12
1.6.1. Células da leucemia mielóide crônica humana (K562 e Lucena-1).....	12
1.6.2. Células da leucemia mielóide aguda humana (HL60) .....	13
1.7. MORTE CELULAR.....	14
1.8. VIAS CLÁSSICAS DA APOPTOSE .....	16
1.8.1. Via intrínseca .....	16
1.8.2. Via extrínseca .....	16
1.9. PROTEÍNAS FOSFATASES.....	18
1.10. CLASSIFICAÇÃO DA PTPs .....	19
1.11. PROTEÍNAS TIROSINA FOSFATASES DE BAIXA MASSA MOLECULAR (LMWPTPS).....	19
1.12. MECANISMOS DE REGULAÇÃO DA ATIVIDADE DE LMWPTPS .....	20
1.12.1. Modulação de LMWPTPs por fosforilação/desfosforilação .....	21
1.12.2. Modulação Redox das PTPs.....	23
1.13. LMWPTPs: Alvos promissores para o tratamento de doenças neoplásicas.	25

1.14. CALIXARENOS.....	27
1.15. PRODUTOS NATURAIS.....	29
1.16. ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ROS).....	34
2. OBJETIVOS.....	39
CAPÍTULO 1.....	41
Antiproliferative action of calix[6]arene on erythroblastic leukemia cells .....	43
CAPÍTULO 2.....	69
Contribution of the Low Molecular Weight Protein Tyrosine Phosphatase for Human Erythroblastic Leukemia Resistance Maintenance .....	71
CAPÍTULO 3.....	91
Modulação do status redox: implicações na ação de antitumorais como indutores da diferenciação e apoptose de células leucêmicas .....	93
3.DISSCUSSÃO GERAL .....	117
4.CONCLUSÃO GERAL.....	127
5.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	131
ANEXOS.....	145

## RESUMO

A eficiência do tratamento da leucemia sob vários aspectos, mesmo com os avanços farmacotecnológicos, ainda permanece como desafio para a medicina. Diante desse fator, maiores informações sobre a base molecular da leucemia e o desenvolvimento de agentes que atuem de forma alvo-específico, apresentem poucos efeitos colaterais e possam impedir o escape das células tumorais à indução de morte são extremamente desejáveis. No presente trabalho, foram abordados 2 aspectos: indução de morte das células leucêmicas por calix[6]areno, flavonóides e diterpeno lactona e contribuição da proteína tirosina fosfatase de baixo massa molecular (LMWPTP) para a resistência de células leucêmicas. As linhagens K562, Lucena-1 (resistente) e HL60 foram utilizadas como modelos no estudo. Calix[6]areno apresentou o mesmo nível de toxicidade para as duas linhagens celulares, mostrando valores de  $IC_{50}$  na faixa de 1-5  $\mu$ M para K562 e 5-10  $\mu$ M para Lucena-1. Calix[6]areno induziu vias apoptóticas como demonstrado pelo aumento da razão Bax/Bcl-2 e clivagem de PARP. A proteína tirosina fosfatase PTEN foi ativada pelo Calix[6]areno, fato relacionado com a diminuição da sobrevivência e proliferação. O Calix[6]areno aumentou a expressão de algumas enzimas antioxidantes e não afetou a atividade da proteína associada com o fenótipo de resistência, P-Glicoproteína. As células Lucena-1, que apresentam alta expressão da P-Glicoproteína, também apresentam altos níveis da LMWPTP. Observamos que quando esta enzima foi silenciada, a resposta frente a quimioterápicos das células leucêmicas se tornou mais eficiente. Por outro lado, o aumento da expressão da LMWPTP em células não resistentes provocou insensibilidade das mesmas à vincristina. Nossos dados sugerem que a LMWPTP contribui com o fenótipo resistente através da ativação das quinases Src e BCR-ABL. Outro aspecto investigado neste trabalho foi a indução da diferenciação e apoptose por compostos naturais. Quercetina e a apigenina apresentaram os dois efeitos desejados a um agente quimioterápico, ou seja, expressiva indução da diferenciação das células e também apoptose. Estes efeitos foram dependentes do tempo e modulação do estado redox celular.

## ABSTRACT

Leukemia therapy efficiency, under several aspects, even with the progress of pharmacotechnology, remains as a challenge in medicine. According to this, new information about the molecular basis of leukemia and development of agents that act on specific target, present low side-effects and prevent cancer cells escaping from death induction, are extremely desirable. In this work 2 aspects were evaluated: death induction of leukemia cells by calix[6]arene, flavonoids and diterpene lactone and the contribution of the low molecular weight protein tyrosine phosphatase (LMWPTP) for leukemia cells resistance. K562, Lucena-1 and HL60 cells were used as models in this study. Calix[6]arene presented the same level of toxicity on K562 and Lucena-1 cells, displaying an  $IC_{50}$  value ranging 1-5  $\mu$ M to K562 cells and 5-10  $\mu$ M to Lucena-1 cells. Calix[6]arene induce apoptosis signaling on both K562 and Lucena cells as molecularly demonstrated by the increased Bax/Bcl-2 ratio and PARP cleavage. Protein tyrosine phosphatase PTEN from leukemia cells became more active in the presence of calix[6]arene, which is related to a decrease of survival and proliferation. Calix[6]arene enhanced the expression of antioxidant enzymes and did not affect P-Glycoprotein activity. Lucena cells, which present high expression of P-Glycoprotein also contain high level of LMWPTP. Interestingly, when this phosphatase was silenced the leukemia cells response appeared to be more efficient towards chemotherapics. On the other hand, overexpression of this enzyme in K562 (non resistant cells) provoked insensitivity to vincristine. Our findings suggest that LMWPTP contributes with the resistance phenotype by supporting the activation status of Src and BCR-ABL kinases. Another aspect examined in this study was the induction of differentiation and apoptosis by natural compounds. Quercetin and apigenin displayed both desired effects of chemotherapics: induction of differentiation and apoptosis. These effects were time- and cellular redox status dependent.

# LISTA DE FIGURAS

## Introdução

Figura 1: Inibidores clássicos da proteína quinase BCR-ABL: (A) Imatinibe (B) Desatinibe (C) Nilotinibe e (D) Bosutinibe ou SKI-606 .....	8
Figura 2: Vias de indução de apoptose .....	17
Figura 3: Modulação de LMWPTPs por fosforilação .....	22
Figura 4: Modulação da atividade LMWPTPs por oxidação .....	25
Figura 5: Estrutura química do calix[6]areno .....	29
Figura 6: Estrutura química da desidrocrotonina .....	30
Figura 7: Estrutura química dos flavonóides .....	31

## Capítulo1

Figure 1: Chemical structure of calix[6]arene .....	46
Figure 2 (A): Calix[6]arene induces toxic effects in leukemia cells .....	51
Figure 2 (B): Calix[6]arene is not toxic for normal human lymphocytes .....	52
Figure 3: Calix[6]arene induces apoptosis of leukemia cells .....	53,54
Figure 4: Analysis of calix[6]arene-induced apoptosis in K562 and Lucena-1 cell	55
Figure 5: Optical microscopy of K562 (A) and Lucena-1(B) .....	56
Figure 6: Calix[6]arene induces cell cycle arrest .....	57
Figure 7: Protein kinase Akt activity and protein tyrosine phosphatase are modulated by calix[6]arene .....	59
Figure 8: Protein c-Myc expression is modulated by calix[6]arene .....	60
Figure 9: Effect of calix[6]arene on antioxidant enzymes expression .....	61
Figure 10: Effect of calix[6]arene on Lucena-1 cells P-Glycoprotein function .....	62

## Capítulo 2

Figure 1: Expression of P-Glycoprotein on both leukemia cell lines .....	77
Figure 2: Low Molecular Weight Protein Tyrosine Phosphatase expression and activity on leukemia cells .....	78
Figure 3: K562 cells overexpressing the LMWPTP are less sensitive towards vincristine .....	79
Figure 4: LMWPTP silencing causes an improvement of cytotoxicity effect of chemotherapics .....	80
Figure 5: Phosphorylation status of Src kinase and BCR-ABL in LMWPTP silencing leukemia cell.....	81
Figure 6: Analysis of P-Glycoprotein activity .....	82
Figure 7: Expression of LMWPTP on leukemia cells treated with vincristine .....	83
Figure 8: Expression and phosphorylation status of kinases .....	84

## Capítulo 3

Figura 1: Avaliação da indução da diferenciação das células HL60 pela Desidrocrotonina (DCTN) e Flavonóides .....	100
Figura 2: Avaliação da indução da diferenciação das células HL60 pelos flavonóides .....	101
Figura 3: Avaliação da indução de apoptose das células HL60 por Desidrocrotonina (DCTN) e Flavonóides .....	102
Figura 4: Efeito da Desidrocrotonina (DCTN) e dos Flavonóides na atividade das Caspases 3 (A) e 9 (B) das células HL60 .....	105
Figura 5: Determinação da glutathiona reduzida em células HL60 .....	107
Figura 6: Determinação da atividade da glutathiona redutase das células HL60 ..	108
Figura 7: Determinação da atividade da tioredoxina redutase das células HL60	110



# **LISTA DE TABELA**

## **Introdução**

Tabela 1: Drogas transportadas pela glicoproteína P e moduladores MDR ..... 11

## **Capítulo 3**

Tabela 1: Avaliação da indução de apoptose das células HL60 por flavonóides e desidrocrotonina ..... 104

## LISTA DE ABREVIATURA

ABL	Abelson tirosina quinase
AIF	<i>apoptosis-inducing factor</i> : fator de indução de apoptose
APAF-1	<i>apoptotic protease-activating factor-1</i> : fator 1 de ativação de apoptose
Bad	<i>Bcl-2 antagonist of cell death</i> : antagonista de Bcl-2 associado a morte celular
Bak	<i>Bcl-2 antagonist killer 1</i> : antagonista de Bcl-2 associado a morte celular
Bax	Bax ( <i>Bcl-2 associated x protein</i> ): proteína x associada a Bcl-2
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma protein 2</i> : proteína inibidora de apoptose detectada primeiramente em linfomas de células B
BCR	Região ponto de quebra
BCR-ABL	Fusão do gene <i>BCR</i> com o gene <i>ABL</i>
BH	Domínio de homologia a Bcl-2
BID	<i>BH3 interacting domain death agonist</i> : agonista de domínio de morte associado a BH3
CARD	<i>caspase activator and recruitment domain</i> : domínio de recrutamento e ativação de caspases
CAT	Catalase
CD45	Tirosina fosfatase hematopoiética célula-específica
Cdc(s)	<i>cell division cycle</i> : proteína(s) reguladora(s) da divisão celular
C-kit	Gene que codifica proteína quinase

CML	Leucemia mielóide crônica
c-Myc	Proteína oncogênica
CuZnSOD	Isoforma de superóxido dismutase dependente de cobre e zinco
DISC	DISC ( <i>death-inducing signaling complex</i> ): complexo intracelular de indução de morte
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EphA2	<i>Ephrin A2 receptor</i> : receptor de efrina A2
FADH <sub>2</sub>	Forma reduzida da <i>flavina adenina dinucleotídeo</i>
Fas/CD95	Membro da superfamília de receptores TNF (fator de necrose tumoral)
FasL	Fas ligante
FGFR	<i>fibroblast growth factor receptor</i> : receptor de fator de crescimento de fibroblastos
GAPDH	Gliceraldeído-3- fosfato desidrogenase
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos
GPX	Glutathione peroxidase
GR	Glutathione reductase
GSH	Glutathione
IAP	<i>inhibitory apoptosis protein type 1</i> : proteína inibidora de apoptose
IC <sub>50</sub>	Concentração do composto que diminui em 50% a viabilidade celular

IL-3	Interleucina 3
IM	Mesilato de imatinibe
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IR	<i>Insulin receptor</i> : receptor insulina
LMWPTP	<i>Low Molecular Weight Protein Tyrosine Phosphatase</i> : Proteína Tirosina Fosfatase de Baixa Massa Molecular
MCSFR	<i>Macrophage colony stimulating factor receptor</i> : receptor do fator estimulador de colônias de macrófagos
MDR	<i>multidrug resistance</i> : fenótipo celular caracterizado pela resistência a múltiplas drogas
MnSOD	Isoforma de superóxido dismutase dependente de manganês
MPN	Neoplasma mieloproliferativa
MRP	Proteína resistente a multidroga
NADPH	Forma reduzida da <i>nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato</i>
NFκB	Fator nuclear kappa B
PARP	<i>poli ADP-ribose polymerase</i> : poli (ADP ribose) polimerasi
PDGFR	<i>Platelet-derived growth factor receptor</i> : Receptor de fator de crescimento derivado de plaquetas
PDK	Fosfatidilinositol dependente de quinase
PVDF	<i>polyvinylidene fluoride</i> : fluoreto de polivinilideno
P-Gp	glicoproteína de permeabilidade
PI	Iodeto de propídeo

PI3K	<i>phosphatidylinositol 3-kinase</i> : fosfatidilinositol-3 quinase
PKB ou Akt	<i>protein kinase B</i> : proteína quinase B
PS	Fosfatidilserina
PTEN	<i>phosphatase and tensin homolog</i> : proteína tirosina fosfatase supresora de tumor
PTK	Proteína tirosina quinase
PTP	Proteína tirosina fosfatase
Raf	Serina-treonina quinase implicada na sinalização de crescimento e sobrevivência celular
RAIDD	<i>Rip associated protein with a death domain</i> : domínio de morte associado a morte
Ras	<i>rat sarcoma viral oncogene</i> : família de proteínas GTPásicas reguladoras de diversas vias de transdução de sinais associadas ao crescimento, diferenciação e apoptose celular
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SDS	Dodecil sulfato de sódio
Ser	Serina
SFK	Quinases da família Src
SH2	Domínio de homologia com Src-2
SOD	Superóxido dismutase
Src	Proteína da família tirosina quinase
STATs	<i>signal transducers and activators of transcription</i> : moléculas transdutoras de sinal e ativadoras de transcrição
TKI	Inibidor de tirosina quinase

TRADD	Domínio de morte associado ao receptor para o TNF
Tyr	Tirosina
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i> : fator de crescimento do endotélio vascular
WHO	<i>World Health Organization</i> : Organização Mundial da Saúde

# **INTRODUÇÃO**

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. CÂNCER X DADOS EPIDEMIOLÓGICOS

O termo câncer é utilizado genericamente para representar um conjunto de mais de 100 doenças, incluindo tumores malignos de diferentes localizações.

A carcinogênese é um processo de múltiplos passos envolvendo anormalidades na expressão e/ou função de proteínas codificadas por uma variedade de genes pertencentes a uma mesma célula. Tais anormalidades afetam o balanço entre proliferação celular, apoptose e diferenciação, e nas malignidades hematopoiéticas levam a uma expansão anormal de clones de células tronco (John *et al.*, 2004). Observa-se que a total transformação celular para a malignidade exige mudança numa gama de genes e apenas anormalidades que desencadeiam proliferação anormal não são suficientes para a gênese da célula maligna. Logo, anormalidades em vários genes das células tronco são necessárias para desregular a proliferação celular e, também, ocasionar o desvio dos controles que poderiam normalmente desencadear apoptose, diferenciação ou senescência (Wong *et al.*, 2008).

Segundo recente relatório da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC)/OMS (*World Cancer Report 2008*), o impacto global do câncer mais que dobrou em 30 anos. A Organização Mundial da Saúde (WHO; World Health Organization)-(<http://www.who.int/cancer/en/>), estima que 12 milhões de pessoas em todo o mundo são diagnosticadas com algum tipo de câncer a cada ano e que 7,6 milhões vão a óbito. O contínuo crescimento populacional, bem como seu envelhecimento, afetará de forma significativa o impacto do câncer no mundo.

No Brasil, segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA)-(<http://www.inca.gov.br>), para os anos de 2010 e 2011 serão registrados 489.270



de casos novos de câncer por ano. Entre esses casos novos, à exceção do câncer de pele do tipo não melanoma, os cânceres de próstata e de pulmão serão os mais incidentes no sexo masculino e os cânceres de mama e do colo do útero no sexo feminino.

No ano de 2007 foi realizado o segundo Congresso Internacional de Controle do Câncer no Rio de Janeiro/Brasil onde foram apresentadas as estimativas de novos casos de leucemia para os anos de 2008 e 2009 no Brasil. Esses dados indicaram que nesses anos seriam registrados 9.540 novos casos de leucemia no Brasil, dos quais 5.220 afetariam indivíduos do sexo masculino e 4.320 do sexo feminino. Nesse mesmo ano foram constatados 5.721 óbitos. As estimativas para 2010 e 2011 apontam um aumento no número de casos de leucemias, sendo esperado um total de aproximadamente 9.580 novos casos, sendo que 5.240 afetarão homens e 4.340 mulheres. As últimas estimativas não mostram tendência de redução da incidência desse tipo de câncer na população brasileira. E ainda tomando como base as estimativas do INCA, as leucemias contribuirão com significativa parcela de novos casos de câncer no Brasil, atingindo principalmente as populações dos maiores centros urbanos. Reconhecidamente estes centros são detentores de precários sistemas de saúde e recursos econômicos insuficientes para o adequado atendimento do grande número de usuários. Desta maneira, terapias mais eficientes no tratamento da leucemia reduziram não somente o número de óbitos, mas também o tempo e recursos gastos durante o tratamento dos pacientes. Os tratamentos químico e radioterápicos são bastante custosos para o sistema público de saúde devido ao relativo alto custo dos fármacos e equipamentos utilizados e, também, da mão-de-obra especializada necessária ao acompanhamento do paciente durante os períodos de internação. Uma terapia mais efetiva que proporcione melhor prognóstico para os pacientes e menores gastos para o Estado será de grande interesse e vantagem para o Brasil.

## **1.2. LEUCEMIA**

As leucemias são neoplasias malignas que afetam as células precursoras hematopoiéticas e se localizam originalmente na medula óssea. Recentemente a designação de desordem mieloproliferativa crônica, foi substituída por neoplasma mieloproliferativa (MPNs) (Vardiman *et al.*, 2009; Klco *et al.*, 2010). A leucemia mielóide crônica (CML) é doença neoplasma mieloproliferativa resultante da expansão clonal de uma célula-tronco hematopoiética multipotente transformada. A CML é um dos primeiros exemplos de alteração cromossomal adquirida ligada a um tumor maligno humano. Esta alteração é decorrente da translocação balanceada entre os cromossomos 9 e 22 gerando um gene de fusão BCR-ABL1. A proteína derivada desta fusão gênica é uma tirosina quinase citoplasmática constitutivamente ativa e que está envolvida na modulação positiva de muitas vias de sinalização que levam ao crescimento e à inibição da morte celular (Druker, 2008). A CML representa um excelente modelo para o estudo de novos mecanismos de tumorigênese devido ao fato do marcador desta doença ser a presença do cromossomo filadélfia, que está presente em mais de 95% dos pacientes e é o principal marcador da doença (Sawyers, 1999; Quackenbush *et al.*, 2000; Deininger *et al.*, 2000; Verfaillie, 1998; Hughes *et al.*, 2006; Klco *et al.*, 2010).

### **1.2.1. Vias de sinalização que estão ativadas na CML**

As células transformadas BCR-ABL1 demonstram redução de dependência de fatores de crescimento, aumento da viabilidade e alteração da adesão celular, que são decorrentes da ativação constitutiva de vias de sinalizações (Quintas-Cardama e Cortes, 2009). Vias como Raf/MEK/ERK; PI3K/PTEN/Akt e Jak/STAT estão frequentemente ativadas em leucemia e outras desordens hematopoiéticas, que são causadas por mutações em mediadores “upstreams” que são responsáveis em grande parte pela proliferação celular (McCubrey *et al.*, 2008).

Algumas proteínas podem interagir com a BCR-ABL1 tais como: GRB2, GAB2, STAT5, subunidade p85 da PI3K, FAK dentre outras (Ren, 2005). A fosforilação do resíduo tyr177 da BCR é essencial no processo de leucemogênese mediado pela BCR- ABL1. Este sítio de fosforilação tem uma alta afinidade pelo domínio SH2 da GRB2, o qual recruta a SOS ativando a Ras (a Ras poderá ativar as vias Raf/MEK/ERK, PI3K/PTEN/Akt) e a GRB2 liga-se a GAB2, formando o complexo GRB2/GAB2, fosforilando a GAB2, que causa a ativação do complexo PI3K/Akt (Quintas-Cardama; Cortes, 2009). A ativação da via de sinalização PI3K tem sido demonstrada ser importante na transformação celular BCR-ABL (Skorski *et al.*, 1995). A PI3K é uma quinase lipídica que gera o PI (3,4,5)P3, o mensageiro essencial para que ocorra a translocação da Akt para membrana plasmática, onde ela é fosforilada e ativada por quinases PDKs. A Akt está correlacionada com funções de proliferação e sobrevivência por fosforilação de uma variedade de substratos (Osaki *et al.*, 2004) e, também regula a maquinaria apoptótica por fosforilações e inativação das proteínas pró-apoptóticas, por exemplo a Bad (Del Peso *et al.*, 1997). Alterações na ativação da via PI3K/Akt têm sido associadas a uma variedade de doenças como câncer e doenças autoimunes (Di Cristofano *et al.*, 1999; Vivanco e Sawyers, 2002).

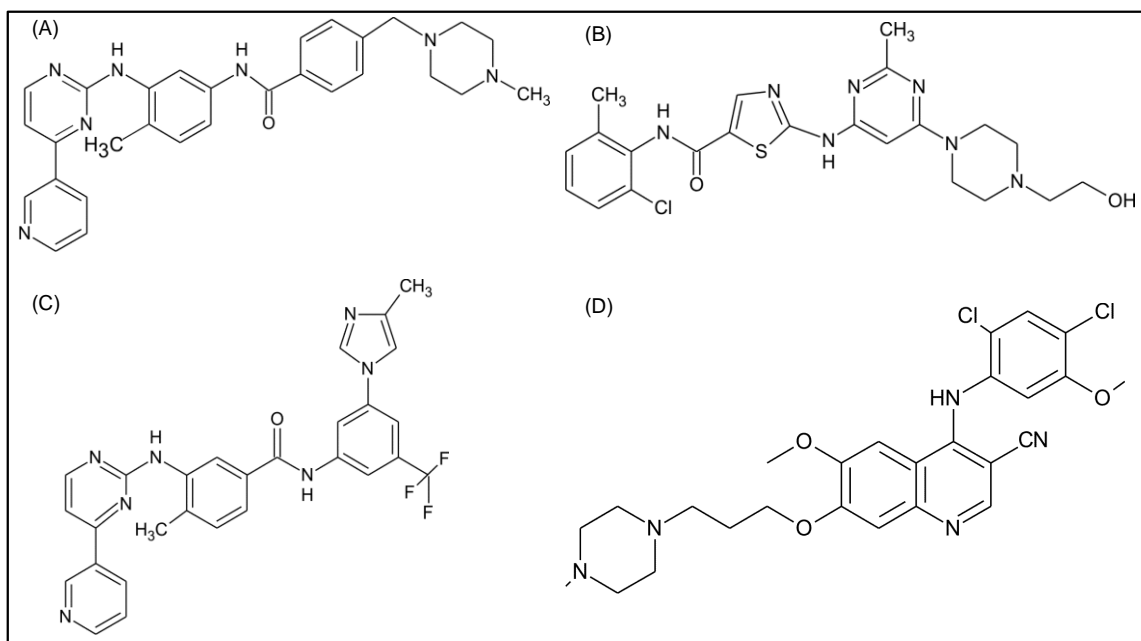
### **1.3. TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO DA LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA**

O mesilato de imatinibe (IM) (conhecido também como: STI571, GLEEVEC®) é um dos fármacos de escolha para o tratamento da CML (figura 1). Este fármaco é um dos primeiros produtos obtidos a partir do desenvolvimento racional de fármacos (Joske, 2008), que é um inibidor de proteínas tirosina quinases. Inicialmente acreditava-se que a sua ação antileucêmica era devida exclusivamente à inibição da proteína quinase BCR-ABL1. No entanto, atualmente sabe-se que o mesmo pode inibir um amplo espectro de quinases. Apesar da aparente eficácia terapêutica do IM, alguns pacientes se tornam intolerantes ao

mesmo e em outros casos, suas células adquirem resistência. A aquisição de resistência pelas células leucêmicas ao IM se deve basicamente a mutações no gene *BCR-ABL* que promovem alterações no sítio de ligação do IM à quinase e das propriedades cinéticas (Druker *et al.*, 2006; Griswold *et al.*, 2006; Breccia e Alimena, 2009).

O fenômeno de resistência levou ao desenvolvimento de inibidores de segunda geração, dentre os quais desatinibe e nilotinibe são os mais estudados (figura 1). O desatinibe é 325 vezes mais potente que o IM em inibir a proteína quinase BCR-ABL1, principalmente por se ligar à quinase tanto na conformação ativa quanto na inativa. Além da BCR-ABL1, o desatinibe também inibe outras quinases relacionadas à doença tais como: c-Kit, PDGFR e Src (Warmuth *et al.*, 2003; Talpaz *et al.*, 2006; Hantschel *et al.*, 2008). Já o nilotinib é de 20 a 50 vezes mais potente que o IM, mas não tem nenhum efeito sobre a Src ou sobre a quinase que apresenta a mutação T315I, na qual ocorre a troca do aminoácido treonina pela isoleucina (Kantarjian *et al.*, 2006). Apesar da potência de inibição destes dois fármacos de segunda geração, existem relatos na literatura sobre a aquisição de resistência também a eles. Assim, inibidores de outras quinases têm sido desenvolvidos: o MK-0457 é um inibidor da aurora quinase e, portanto, afeta a formação do fuso mitótico e consequentemente induz apoptose (Giles *et al.*, 2007). Além dos inibidores mencionados acima, existe o inibidor SKI006 (Bosutinibe) que atua sobre quinases da família Src (SFK) e Abl. Ao contrário do imatinibe e desatinibe, esse inibidor é mais específico por não inibir significativamente a atividade das quinases c-Kit e PDGFR (Golas *et al.*, 2003; Golas *et al.*, 2005).

A primeira mutação na BCR-ABL1 reportada foi a T315I, na qual ocorre a troca do aminoácido treonina pela isoleucina (Gorre *et al.*, 2001). Alguns inibidores de tirosina quinase (TKIs), têm demonstrado efeito sobre esta mutação, como por exemplo: MK-0457 (Giles *et al.*, 2007), PHA-739358 (Modugno *et al.*, 2007), VE-465 (Tauchi, 2006) e XL228 (Shah N, 2007).



**Figura 1:** Inibidores clássicos da proteína quinase BCR-ABL: **(A)** - Imatinibe **(B)** - Desatinibe **(C)** - Nilotinibe e **(D)** - Bosutinibe ou SKI-606.

## 1.4. RESISTÊNCIA A MÚLTIPLAS DROGAS (MDR)

A aquisição de resistência a agentes quimioterápicos ainda constitui o principal obstáculo no tratamento de pacientes com câncer, especialmente nos casos de neoplasias hematológicas. Onde, ao contrário do que ocorre com tumores sólidos, o tratamento cirúrgico mostra-se pouco viável, fazendo com que a quimioterapia ainda seja a principal conduta terapêutica de escolha. Por esta razão, a elucidação dos mecanismos que conferem resistência a fármacos com diferentes alvos e estruturas químicas, é uma das principais metas dos pesquisadores da área, nos últimos 35 anos. (O'connor, 2007).

A resistência a fármacos pode se manifestar clinicamente logo nos estágios iniciais de tratamento, constituindo o fenômeno de resistência “de novo” ou ser induzida durante a quimioterapia, quando células mais “sensíveis” são eliminadas. Em consequência, observa-se que essa resistência genética pode ser induzida tanto como pelo próprio tratamento com agentes anti-neoplásicos como pode

emergir um evento espontâneo (Kappelmayer *et al.*, 2004; Nobili *et al.*, 2006). Como um mecanismo de caráter multifatorial, o fenótipo MDR (*multidrug resistance*), tem sido associado a uma série de alterações celulares (Szakacs *et al.*, 2006). Pesquisas mostram três principais mecanismos de resistência a drogas nas células tumorais, tais como:

- 1) Diminuição no transporte para drogas hidrofílicas, como por exemplo, análogos de nucleosídeos, cisplatina, as quais requerem transportadores para entrarem na célula;
- 2) Alterações nas células, afetando a capacidade das drogas citotóxicas para induzir morte das células, incluindo: alteração no ciclo celular, aumento do reparo de danos de DNA, redução de apoptose e alteração no metabolismo de xenobióticos;
- 3) Aumento do efluxo dependente de energia de drogas hidrofóbicas que facilmente entram na célula por difusão através da membrana plasmática.

Dentre os vários mecanismos identificados o mais comumente encontrado envolve o aumento do efluxo de drogas citotóxicas hidrofóbicas através de um sistema dependente de energia, mediado por membros da família transportadores ABC (*"ATP-binding cassette transporters"*). Primeiramente descritos na década de 70, vários membros da família transportadores ABC têm mostrado ser potentes indutores de MDR, destacando-se o papel da glicoproteína-P (P-Gp) (Hirose *et al.*, 2003; Al-Shawi *et al.*, 2005 e Lage, 2008).

## **1.5. TRANSPORTADORES ABC**

A superfamília ABC consiste de aproximadamente 300 proteínas transportadoras (Szakacs *et al.*, 2006; Higgins, 2007). Dentre as quais destacamos três subfamílias transportadores ABC: ABCB1 (MDR1-P-Gp), ABCC1(MRP1) e ABCG2 (BCRP ou MXR), capazes de conferir fenótipo MDR. A

ativação das proteínas transportadoras da superfamília ABC pode estar associada com mudanças na atividade do sistema de proteção e vias de transdução de sinais envolvendo regulação, proliferação, diferenciação e apoptose em diferentes tipos celulares (Stavrovskaya e Stromskaya, 2008).

O modelo de efluxo de drogas mais estudado foca-se na atividade da P-Gp, uma proteína transmembrana de 170 kDa, originalmente isolada de células de ovário de hamster chinês em 1976 (Juliano e Ling, 1976). Esta proteína cliva ATP provendo a energia necessária para a extrusão de xenobióticos. O aumento na expressão de P-Gp, produto gênico de *mdr1*, tem mostrado ser fator suficiente para a aquisição do fenótipo MDR e consequentemente, resistência frente ao tratamento com várias drogas lipossolúveis incluindo antraciclinas (doxorrubicina), alcalóides da vinca (vinblastina, vincristina), antibióticos (dactinomicina) (tabela 1). De fato, células com alta expressão de P-Gp são capazes de expelir uma grande variedade de drogas estruturalmente não relacionadas, impedindo que níveis intracelulares tóxicos sejam alcançados (Rumjanek *et al.*, 2001; Lage, 2008).

Na tentativa de combater a resistência de células tumorais, muitos inibidores de MDR, especialmente de P-Gp, foram identificados, porém nenhum deles se mostrou eficiente clinicamente e muitos foram excluídos por apresentar alta toxicidade. Apesar do pouco sucesso das primeiras drogas estudadas ainda é grande o esforço dispensado na busca de inibidores de MDR não tóxicos e menos propensos a interações com as atuais drogas anti-neoplásicas. Atualmente está em desenvolvimento uma terceira geração de drogas capazes de inibir especificamente P-Gp, sem alterar a farmacocinética das drogas anti-tumorais (Ozben, 2006; Szakacs *et al.*, 2006).

**Tabela 1:** Drogas transportadas pela P-Glicoproteína e moduladores MDR

<b>DROGAS TRANSPORTADAS POR MDR1 OU P-Gp</b>	<b>MODULADORES MDR</b>
<b>Antraciclinas:</b> daunorrubicina e doxorubicina	<b>Bloqueadores de canal de cálcio:</b> verapamil, nifedipino e azidopina
<b>Alcalóides da vinca:</b> vinblastina, vincristina e vindesina	<b>Imunossupressores e derivados:</b> ciclosporina A, valspodar (PSC833) e tacrolimus.
<b>Epipodofilotoxinas:</b> etoposídeo e teniposídeo	<b>Antiarrítmicos:</b> quinina, quinidina e amiodarona
<b>Antibióticos:</b> actinomicina D, dactinomicina, mitomicina C	<b>Antihipertensivo:</b> reserpina
<b>Taxanos:</b> paclitaxel	<b>Antibióticos:</b> Cefalosporinas
<b>Outros:</b> conchicina, topotecan, valinomicina, puromicina, emetina, digoxina e imatinibe	<b>Hormônios esteróides e derivados:</b> progesterona e tamoxifeno

Adaptado de: Lage H, 2008 e <http://nutrigene.4t.com/humanabc.htm>



## **1.6. MODELOS CELULARES UTILIZADOS NESTE TRABALHO**

### **1.6.1. Células da leucemia mielóide crônica humana (K562 e Lucena-1)**

#### K562

A K562 é linhagem celular da leucemia eritroblástica humana, não resistente, que foi estabelecida por Lozzio e Lozzio a partir de células coletadas de 53 pacientes do sexo feminino com CML em crise blástica terminal. Esta linhagem tem como marcador molecular específico o cromossomo filadélfia (Lozzio e Lozzio, 1975).

#### Lucena-1

A linhagem Lucena-1 é derivada da linhagem eritroleucêmica humana K562 que foi desenvolvida como linhagem celular resistente a múltiplas drogas sendo originalmente selecionada pela resistência ao alcalóide vincristina. A Lucena-1 caracteriza-se pela alta expressão de P-Gp e tem sua resistência revertida por quimiossensibilizadores como verapamil, trifluorperazina e pelas ciclosporinas A, D e G. Também foi demonstrada a capacidade do azul de metileno em parcialmente reverter a resistência dessas células. Contrariamente, o uso de 5-fluoracil demonstra aumentar a resistência de Lucena-1. Em adição a quimioterápicos, Lucena-1 também mostra resistência a ação de radiação ultravioleta-A e peróxido de hidrogênio sendo também caracterizada pela falha na mobilização intracelular de cálcio quando tapsigargina é usada (Rumjanek *et al.*, 2001).

### **1.6.2. Células da leucemia mielóide aguda humana (HL60)**

A diferenciação celular é o processo em que as células se especializam e “ganham” dessa forma, funções definidas. Portanto, na hematopoese, o bloqueio desse processo culmina com um acúmulo de células mielóides imaturas caracterizando a leucemia mielóide aguda (LMA). Basicamente, as LMAs são classificadas e diagnosticadas com base em características morfológicas, marcadores imunológicos e/ou citogenéticos.

Células da leucemia promielocítica humana (HL60) têm servido como sistema modelo para o estudo *in vitro* da diferenciação de células leucêmicas, bem como alvo do estudo de novas drogas que poderão ser utilizadas na prevenção e tratamento dos diferentes tipos de leucemias (Uzunoglu *et al.*, 1999).

As células HL60 são não diferenciadas (blastos), pois não apresentam o gene que codifica a proteína p53 (responsável pelo reparo do DNA ou indução da apoptose) e expressam em grande quantidade as proteínas Bcl-2 e c-Myc (antiapoptóticas), as quais contribuem para a carcinogênese (imortalidade celular) (Blagosklonny *et al.*, 1996; Wall *et al.*, 1999). As células HL60 podem se diferenciar em granulócitos e/ ou monócitos por ação de alguns compostos (ácido retinóico, dexametasona, arabinofuranosilcitosina C e vitamina D) (Uzunoglu *et al.*, 1999). Os níveis da proteína Bcl-2 diminuem significativamente durante a diferenciação destas células e a expressão da proteína c-Myc está correlacionada com o estado proliferativo das células HL60 (Blagosklonny *et al.*, 1996).

## 1.7. MORTE CELULAR

A morte celular pode ser classificada de acordo com a sua morfologia, critérios enzimológicos/bioquímicos e características imunológicas (Melino, 2001). Basicamente existem três tipos de morte celular: necrose, autofagia e apoptose.

A Morte celular autofágica é definida morfologicamente por um tipo de morte celular que ocorre na ausência da condensação da cromatina, mas acompanhada por uma vacuolização autofágica do citoplasma. Além disso, as células autofágicas têm pouca ou nenhuma associação com fagócitos (Kroemer *et al.*, 2009). O mecanismo de autofagia e o perfil celular autofágico final estão sendo relacionados às reações celulares defensivas contra injúrias não letais, enquanto a apoptose seria desencadeada em situações de injúrias letais (Assunção Guimarães e Linden, 2004). Interessantemente, a autofagia também tem mostrado ser responsável pela morte de parte das células neuronais em doenças como Parkinson (Anglade *et al.*, 1997), Alzheimer (Cataldo *et al.*, 1996) e outras doenças mediadas por príons (Jeffrey *et al.*, 1992).

Já a morte celular necrótica ou necrose é morfologicamente caracterizada pelo ganho no volume celular, inchaço das organelas, ruptura da membrana e subsequente perda de conteúdo intracelular (Kroemer *et al.*, 2009). Provocada por injúria celular ou tecidual (Martin, 1993). Nesta condição um grande grupo de células é afetado e lisado ao mesmo tempo causando uma resposta inflamatória e alterando o tecido e/ou órgão irreversivelmente. Na necrose, no início do processo ocorre alteração da função mitocondrial diminuindo drasticamente a produção de ATP, o que prejudica o funcionamento da bomba de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , levando à tumefação celular (entrada de água) pelo aumento de  $\text{Na}^+$  citosólico. O aumento do  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico provoca ativação de fosfolipases e de proteases, que juntamente com o aumento de ROS leva a ruptura da membrana plasmática e à ativação de proteases que é responsável pela desestruturação do citoesqueleto, levando ao extravazamento do conteúdo celular e conseqüentemente, provocando migração de grande quantidade de macrófagos (ativação da resposta imune). Ao contrário

da retração (encolhimento) observada em células apoptóticas, na necrose ocorre um rápido entumescimento celular devido, em parte, aos danos no citoesqueleto e inibição das bombas de íons, que levam à perda da seletividade da membrana (Kroemer *et al.*, 2009)

A apoptose é acompanhada por alterações morfológicas como: arredondamento celular, retração de pseudópodos, redução do volume celular, condensação da cromatina, fragmentação nuclear, pouca modificação nas organelas citoplasmáticas, perda da assimetria da membrana plasmática e formação de corpos apoptóticos. O mecanismo apoptótico tem sido revisto e evidências sugerem que, na verdade, este não é um mecanismo único, mas um conjunto de múltiplos mecanismos que levam a uma morfologia apoptótica comum. A morte celular por apoptose é desencadeada com a ativação de caspases, perda do potencial de membrana, completa permeabilização da membrana mitocondrial externa, exposição da fosfatidilserina (PS) e englobamento das células apoptóticas por fagócitos (Kroemer *et al.*, 2009). Porém, a ativação de caspases como resultado do estímulo de morte, parece não ser sempre pré-requisito para o desencadeamento apoptótico, já que em alguns modelos experimentais, a inibição de caspases não resulta em inibição da morte celular por apoptose. Vias de morte celular independentes de caspases têm sido reportadas na literatura (Jurgensmeier *et al.*, 1998) bem como em situações onde outras proteases tais como calpaína e serina proteases são ativadas (Squier *et al.*, 1994; Jurgensmeier *et al.*, 1998; Assefa *et al.*, 2000). Esses dados mostram que a morfologia apoptótica clássica pode ser alcançada tanto pela ativação de caspases quanto por outras famílias de proteases, embora as exatas características citológicas da degeneração celular possam variar levemente entre as diferentes formas de morte.

## **1.8. VIAS CLÁSSICAS DA APOPTOSE**

Pelo menos duas vias podem disparar a apoptose, sendo que estas são finamente reguladas, a via intrínseca e a extrínseca (figura 2).

### **1.8.1. Via intrínseca**

A via intrínseca é desencadeada em resposta à sinais de injúria e stress celular. Os membros anti-apoptóticos da família Bcl-2 regulam a inibição da Bax/Bak, mas quando temos a dominância de fatores pró-apoptóticos como Bax/Bak, a apoptose é favorecida, ocorrendo a oligomerização deles que são responsáveis pela permeabilização mitocondrial, permitindo a liberação de proteínas pró-apoptóticas como citocromo C, do espaço intermembranar da mitocôndria para o citoplasma, que se liga ao adaptador de morte Apaf1 (Apaf1 se liga ao citocromo C, nesse processo utiliza-se ATP) na porção c-terminal, formando o apoptossoma, é induzido a sua oligomerização e é exposto o domínio de recrutamento de caspases (CARD), que recruta a pró-caspase 9, que ativa a caspase 9 e em seguida esta cliva a pró-caspase 3 que ativa a caspase 3 ou a caspase 7. Uma vez ativada, as caspases (cisteíno proteases) clivam proteínas importantes, orquestrando dessa forma, a morte celular. Esta via é regulada em muitos níveis, incluindo o nível transcricional e pós-transcricional de membros da família Bcl-2, através ainda da expressão de componentes efetores de morte e de inibidores de caspases, denominadas proteínas inibidoras da apoptose (IAPs).

### **1.8.2. Via extrínseca**

A via extrínseca de indução de morte celular é desencadeada à partir da ativação de receptores de superfície celular, tais como: Fas/CD95, TNFR e o DR5 que se liga ao seu respectivo ligante FasL, TNF e TRAIL. Uma vez ligado a seu respectivo receptor, forma o complexo de sinalização de indução de morte (DISC) que geralmente está associado a proteínas adaptadoras, logo esse complexo ativa a pró-caspase 8, que ativa a caspase 8 e por fim ativa a caspase 3, a executora



## 1.9. PROTEÍNAS FOSFATASES

A fosforilação de proteínas mediada pelo balanço entre a ação de proteínas quinases (PKs) e proteínas fosfatases (PPs), é reconhecida como fator crucial na geração e regulação de sinais necessários para a sobrevivência, proliferação, diferenciação e morte celular. De fato, as células respondem aos estímulos internos e externos através da ativação ou inibição de diferentes vias de sinalizações intracelulares as quais agem vias cascatas de reações seqüenciais de fosforilação ou desfosforilação reguladas pela ação de PKs e PPs, respectivamente (Aoyama *et al.*, 2003; Tonks, 2005; Ferreira *et al.*, 2006). Em particular, a ação integrada de proteínas tirosina quinases (PTKs) e proteínas tirosina fosfatases (PTPs) no controle da fosforilação reversível de proteínas em resíduos de tirosina, é reconhecida como fator crítico na regulação da transdução de sinais em condições normais e patológicas.

Em conjunto, PTPs e PTKs regulam a fosforilação reversível de proteínas em resíduos de tirosina, evento de fundamental importância no controle de diversos processos fisiológicos tais como crescimento e diferenciação celular, metabolismo, alterações de citoesqueleto, ciclo celular e respostas imunológicas. De acordo, o descontrole nas atividades de PTKs e PTPs está associado ao desenvolvimento de inúmeras doenças genéticas ou adquiridas tais como diabetes, câncer e distúrbios autoimunes (Andersen *et al.*, 2004; Malentacchi *et al.*, 2005; Ferreira *et al.*, 2006; Tautz e Mustelin, 2007).

## 1.10. CLASSIFICAÇÃO DA PTPs

A classificação desta família tem sido baseada nos resíduos de aminoácidos presentes em seus domínios catalíticos. As PTPs podem ser agrupadas em quatro classes diferentes:

a) **classe I**: representadas pelas PTPs “clássicas” e PTPs de especificidade dual, são caracterizadas pela presença, no sítio ativo, de um resíduo de cisteína fundamental para a catálise enzimática e que confere a este grupo de enzimas susceptibilidade a agentes oxidantes.

b) **classe II**: assim como a classe I, também agrupa enzimas com mecanismo catalítico baseado num resíduo de cisteína, mas que parecem ter uma origem mais antiga que as primeiras. Em humanos são representadas pelas proteínas fosfatase tirosina-específicas de baixa massa molecular (LMWPTPs).

c) **classe III**: são representadas por fosfatases tirosina/treonina específicas como o grupo de fosfatases Cdc25 cuja ação, também mediada por um resíduo de cisteína, constitui evento importante na progressão do ciclo celular.

d) **classe IV**: agrupa enzimas com mecanismo catalítico baseado num resíduo de aspartato e dependente de cátion.

## 1.11. PROTEÍNAS TIROSINA FOSFATASES DE BAIXA MASSA MOLECULAR (LMWPTPS)

A classe II representada pelas proteínas tirosina fosfatases de baixa massa molecular (LMWPTPs) representam uma família de enzimas tirosina específicas evolutivamente conservadas as quais são amplamente expressas em diferentes tecidos humanos. LMWPTPs exercem importante papel no rearranjo do citoesqueleto e na regulação dos processos de crescimento, proliferação, adesão e migração celular. De fato, membros dessa família são capazes de se associar e desfosforilar vários receptores de fatores de crescimento/proliferação tais como:



PDGFR (receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas), FGFR (receptor do fator de crescimento de fibroblastos), MCSFR (receptor do fator estimulador de colônia de macrófagos), IR (receptor de insulina) e EphA2 (receptor de efrina A2) exercendo, portanto, regulação negativa sobre muitas das funções de receptores tirosina quinase que levam a divisão celular. Adicionalmente proteínas ancoradoras e várias outras proteínas pertencentes a vias de sinalização mostram ser substratos de LMWPTP entre as quais STAT5, p190 RhoGap, p125FAK,  $\beta$ -catenina e caveolina-1 (Raugei *et al.*, 2002; Rigacci *et al.*, 2002; Souza *et al.*, 2009).

Embora alguns grupos de pesquisa tenham se dedicado ao estudo das funções fisiológicas das LMWPTPs e da associação da atividade desregulada da enzima na gênese e progressão de estados patológicos, até o momento pouco é conhecido sobre as exatas funções fisiológicas das LMWPTPs. Contudo, crescente número de trabalhos tem destacado as implicações da alteração na expressão ou atividade desse grupo de enzimas no desenvolvimento de diversas patologias, tais como alergias, obesidade, hipertrofia cardíaca, Alzheimer e câncer, reforçando o papel fundamental das LMWPTPs na regulação de processos biológicos cruciais da fisiologia celular (Bottini *et al.*, 2000; Bottini *et al.*, 2002; Bottini *et al.*, 2007).

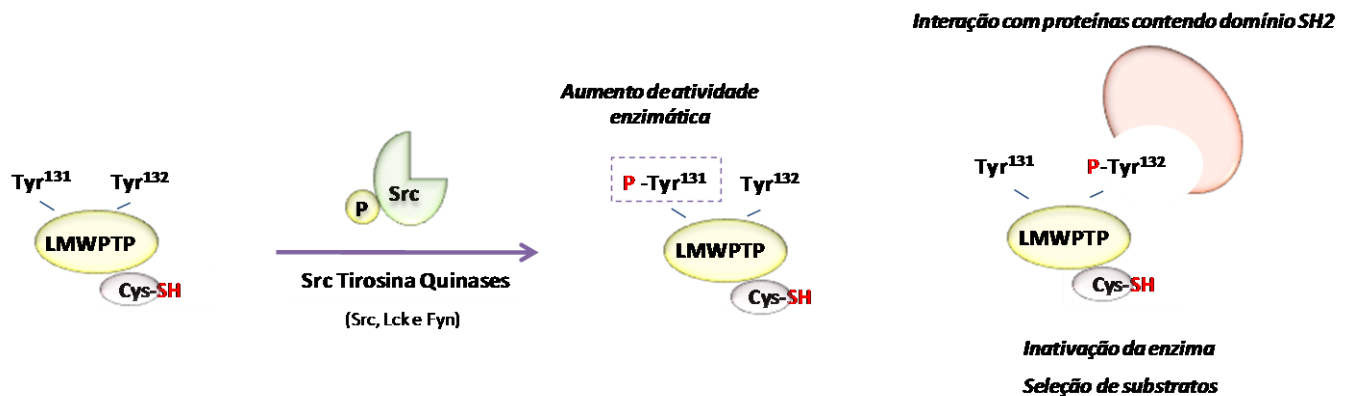
## **1.12. MECANISMOS DE REGULAÇÃO DA ATIVIDADE DE LMWPTPS**

A regulação da atividade de LMWPTPs constitui um mecanismo complexo baseado na fosforilação/desfosforilação da enzima e oxidação reversível do resíduo de cisteína presente no sítio catalítico.

### **1.12.1. Modulação de LMWPTPs por fosforilação/desfosforilação**

A fosforilação das LMWPTPs nos resíduos de Tyr131 e Tyr132 pelas quinases da família Src (c-Src, Lck e Fyn) induz diferentes efeitos no comportamento da enzima, constituindo um importante mecanismo de regulação da sua atividade e capacidade de interação com outras proteínas (Tailor *et al.*, 1997; Bucciantini *et al.*, 1999). De maneira interessante pode-se observar que embora a tirosina quinase Src possa fosforilar tanto Tyr131 quanto Tyr132 em LMWPTPs, a fosforilação de Tyr131 induz um aumento de aproximadamente 25 vezes na atividade da fosfatase enquanto a fosforilação em Tyr132 mostra não afetar a atividade da enzima.

A função biológica da fosforilação de LMWPTPs em Tyr132 tem sido investigada. Um possível papel para esse evento tem sido relacionado ao fato de Tyr132 ser seguida pela sequência G-N-D gerando um motivo de reconhecimento de domínio SH2. Bucciantini e colaboradores (1999) demonstraram que a proteína Grb2, que contém domínio SH2, pode se ligar a LMWPTPs mas somente quando a fosfatase apresenta-se fosforilada em Tyr132 sugerindo que a forma fosforilada desse resíduo de aminoácido constitua um sítio de reconhecimento de LMWPTPs por proteínas que apresentam domínio SH2. Uma segunda hipótese sobre o papel fisiológico da fosforilação em Tyr132 tem como base os efeitos da interação das LMWPTPs com proteínas contendo domínios SH2 na atividade catalítica da própria enzima. De fato, considerando a grande proximidade de Tyr132 em relação ao sítio ativo das LMWPTPs, a ligação de proteínas contendo domínio SH2 à forma fosforilada da enzima poderia afetar o acesso de substratos ao sítio ativo levando à inativação da enzima ou seleção de substratos por tamanho. De uma maneira geral a fosforilação de LMWPTPs em ambos resíduos de tirosina tem sido considerado um mecanismo de controle dos níveis de atividade da enzima e/ou da especificidade por substratos (figura 3).



**Figura 3:** Modulação de LMWPTPs por fosforilação. Tirosina quinases da família Src podem fosforilar LMWPTPs tanto Tyr131 quanto Tyr132. A fosforilação em Tyr131 por Src induz aumento na atividade específica de LMWPTPs enquanto a fosforilação em Tyr132 afeta a capacidade de interação da enzima com proteínas que possuam domínio SH2 e a acessibilidade dos substratos ao sítio ativo.

A ação de LMWPTPs sobre substratos específicos depende de sua localização intracelular a qual mostra também ser controlada por eventos de fosforilação/desfosforilação da enzima. Apesar de LMWPTPs residirem constitutivamente tanto na fração celular citosólica quanto na associada ao citoesqueleto, a forma fosforilada da enzima tem sido encontrada na fração associada ao citoesqueleto enquanto somente a fração citosólica parece ser capaz de interagir com PDGFR ativado (Bucciantini *et al.*, 1999). Desta forma, a localização intracelular das LMWPTPs demonstra estar intimamente associada as diferenças de especificidade por substratos entre as formas da enzima associadas à membrana plasmática e as encontradas associadas ao citoesqueleto. Como mencionado anteriormente, LMWPTPs associadas a membrana são capazes de se ligar e desfosforilar PDGFR enquanto a fração da enzima associada ao citoesqueleto age sobre substratos que se tornam fosforilados em tirosina, após ativação do receptor. Caselli e colaboradores (2007), demonstraram que LMWPTPs também tem sua atividade enzimática regulada pela ligação da enzima a caveolina-1, principal constituinte de microdomínios de membrana ricos em esfingolípídios e colesterol denominados cavéolos, os quais têm sido implicados numa variedade de funções celulares incluindo eventos de transdução de sinal.

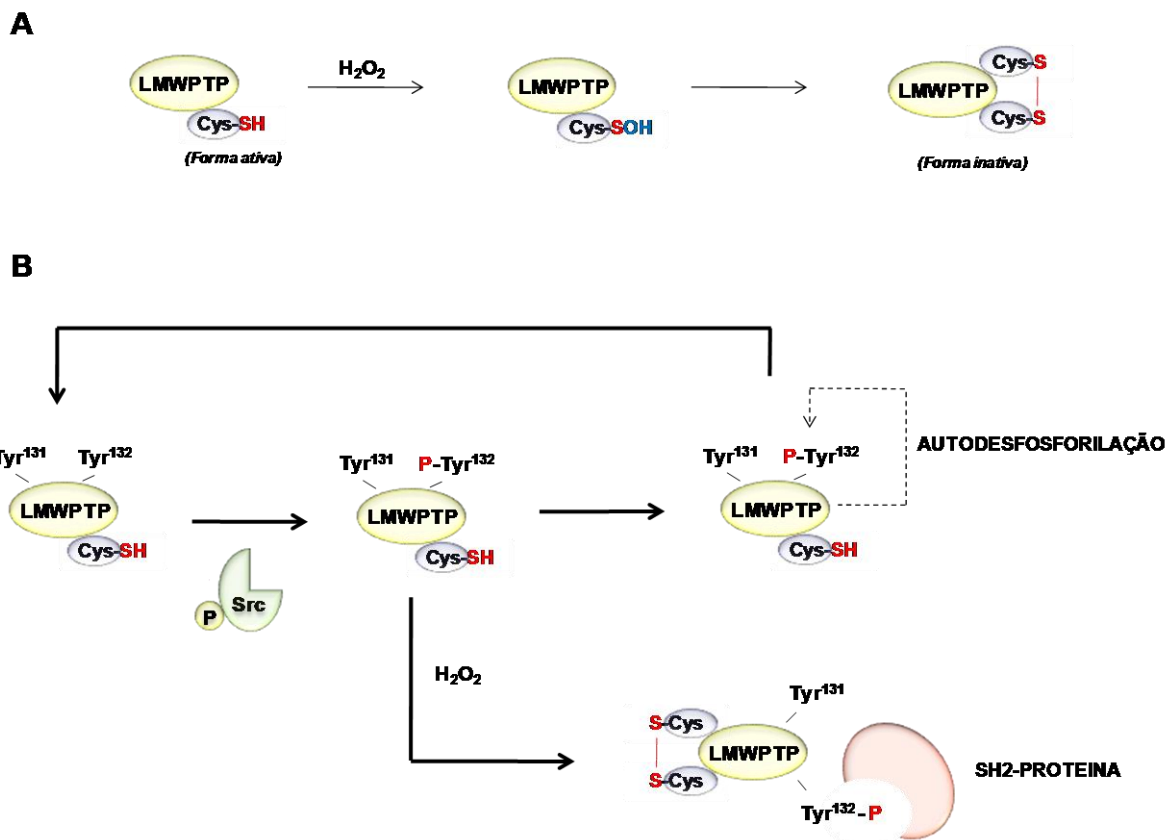
Ambas isoformas de LMWPTP são capazes de interagir com regiões definidas da caveolina-1 levando à formação de complexos LMWPTP/caveolina-1 e, simultaneamente, à inibição da atividade da enzima, principalmente no caso de HCPTPA/IF1. A regulação da atividade de LMWPTPs por caveolina-1 constitui um indício adicional da associação da atividade desta enzima ao desenvolvimento de tumores e do fenótipo MDR tumoral. Portanto, a caveolina-1 tem demonstrado exercer importante função no desenvolvimento tumoral agindo tanto como supressora como promotora de tumor, dependendo do tipo celular, além de estudos recentes também evidenciarem a participação de caveolina-1 na aquisição de fenótipo MDR em células tumorais (Lavie *et al.*, 2001).

### **1.12.2. Modulação Redox das PTPs**

Espécies reativas de oxigênio (ROS), tais como  $O_2^{\bullet-}$  ou  $H_2O_2$ , são transitoriamente geradas no meio intracelular durante várias condições fisiológicas ou patológicas. Nestas circunstâncias a produção de moléculas reativas parece atuar na indução do aumento de proteínas fosforiladas em tirosina, um evento que pode estar associado a ativação de PTKs e/ou inativação de PTPs. De fato, recentes evidências demonstram que ambos os mecanismos são induzidos por oxidantes os quais podem não somente modular de maneira reversível a atividade de PTPs mas também a atividade de PTKs (Raugei *et al.*, 2002; Chiarugi e Buricchi, 2007). PTKs são ativadas quando expostas à ambientes oxidantes de maneira que a oxidação de resíduos de cisteína resulta em direto aumento da atividade quinásica das enzimas. No caso de PTPs, como LMWPTPs, a oxidação de resíduos de cisteína presentes no sítio ativo tem como resultado efeito contrário ao observado em quinases levando à inativação catalítica desse grupo de fosfatases. Na presença de agentes oxidantes tais como  $H_2O_2$  e ROS, ocorre oxidação da cisteína (Cys-SH) no sítio catalítico, formando ácido sulfênico (Cys-OH). A fim de evitar a reação de Cys-OH com outra molécula reativa e uma conseqüente inativação irreversível da atividade enzimática de LMWPTPs, agentes tais como tioredoxina (TRX), glutaredoxinas (GRX) e glutathiona reduzida

desempenham papel fundamental na recuperação da atividade catalítica da enzima oxidada (Figura 4A). A oxidação das LMWPTPs resulta não somente na inibição da atividade enzimática, mas também ocasiona a potencialização da ação de PTKs, como as da família Src, sobre a fosfatase. Uma vez fosforilada, LMWPTPs oxidadas/inibidas não podem desfosforilar a si mesmas e, portanto, não são capazes de conter a ação das PTKs. Tal mecanismo é essencial para a modulação de vias de transdução de sinal disparadas por receptores de fatores de crescimento, como as induzidas pela ativação de PDGFR, FGFR e MCSFR, onde o aumento na produção de ROS em resposta à ativação do receptor acaba levando a simultânea ativação de PTKs e inibição de PTPs como LMWPTPs. Na sinalização via PDGFR, a fosforilação e ativação de Src leva a fosforilação de LMWPTPs em Tyr132, criando um sítio de ligação para proteínas que possuam domínio SH2 e um ponto para a formação de complexos de sinalização envolvidos na transdução de sinais mitogênicos. A oxidação e inativação de LMWPTPs, que acompanha o processo, previne a autodesfosforilação da fosfatase e também a desfosforilação de PDGFR (Figura 4B).

Estudos demonstraram que a ativação de fatores de crescimento como PDGFR induzem de maneira transiente o aumento de ROS através da ativação do complexo de membrana NADPH oxidase (Catarzi *et al.*, 2005). LMWPTP é oxidada *in vivo* após a ativação de PDGFR levando à incapacitação da enzima em substratos como p190Rho-GAP e o próprio PDGFR. A oxidação de LMWPTP pode ser revertida pelo sistema glutaredoxina/glutathione/glutathione redutase/NADPH (Chiarugi *et al.*, 2001) levando à recuperação da atividade catalítica da enzima, através de uma redução da ponte S-S entre as duas cisteínas presentes no sítio catalítico. O mesmo mecanismo redox de regulação da atividade de LMWPTPs pode ser observado durante a ativação de receptores de efrina (Parri *et al.*, 2005) reforçando o conceito de que ciclos de oxidação/redução da enzima durante os eventos de sinalização disparados por fatores de crescimento constituem mecanismo fundamental de regulação da atividade de LMWPTPs.



**Figura 4:** Modulação da atividade LMWPTPs por oxidação. **(A)** Em presença de ROS, tais como  $H_2O_2$ , a oxidação de cisteína no sítio catalítico leva a transformação do resíduo sulfidrílico (Cys-SH) em ácido sulfênico (Cys-SOH). **(B)** A oxidação das LMWPTPs resulta não somente na inibição da atividade enzimática mas também ocasiona a potencialização da ação de PTKs, como as da família Src, sobre a fosfatase.

### 1.13. LMWPTPs: alvos promissores para o tratamento de doenças neoplásicas

A fosforilação de proteínas em resíduos de tirosina constitui o mecanismo fundamental na geração de sinais associados à indução de crescimento, proliferação, migração e invasão de células normais e malignas. A ação coordenada entre PTKs e PTPs desempenha papel crítico no controle de eventos celulares, sendo que o desajuste na atividade e/ou expressão de tais enzimas está intimamente associado ao processo de tumorigênese e progressão tumoral. Nesse

contexto LMWPTPs vêm ganhando crescente destaque na literatura científica como alvo promissor no tratamento de doenças neoplásicas. Vários trabalhos têm evidenciado a alteração de atividade e/ou expressão dessas fosfatases em diferentes tipos de cânceres.

Estudos demonstraram que a atividade da LMWPTPS está fortemente correlacionada ao desenvolvimento e progressão de tumores (Marzocchini, 2008). De acordo, análises de tumores humanos têm revelado alta prevalência da forma desfosforilada e oncogênica do receptor Eph A2, o que tem sido associado ao aumento da expressão de LMWPTPs (Kikawa *et al.*, 2002; Chiarugi *et al.*, 2004).

Malentacchi e colaboradores (2005) avaliaram os níveis de expressão de LMWPTPs em amostras de tumores de mama, cólon, pulmão e em neuroblastoma. Os resultados mostraram aumento na expressão de LMWPTPs na maioria das amostras analisadas indicando também a existência de significativa correlação entre os níveis de expressão de LMWPTPs com as principais características clínico-patológicas comuns a cada tipo de câncer. Adicionalmente, o aumento na expressão de LMWPTPs demonstrou ser indicativo de prognóstico menos favorável, constituindo marcador da agressividade tumoral.

Caselli e colaboradores (2007) demonstraram que a ligação das LMWPTPs com caveolina-1, principal componente dos cavéolos de membrana, induz a inibição da atividade dessas enzimas, efeito mais intensamente observado em HCPTPA/IF1. De maneira interessante o mesmo grupo (Caselli *et al.*, 2001) demonstrou que a própria caveolina-1 na sua forma tirosina-fosforilada, constitui substrato fisiológico de LMWPTPs indicando a complexa interação estabelecida entre essas fosfatases e caveolina-1. O papel da caveolina-1 no desenvolvimento do câncer tem sido extensivamente estudado demonstrando que esta proteína pode, dependendo do tipo celular e estado de fosforilação agir tanto como proteína supressora de tumor ou agente oncogênico. Adicionalmente crescente número de trabalhos tem apontado a participação da caveolina-1 na aquisição do fenótipo MDR em células tumorais (Lavie *et al.*, 2001; Pang *et al.*, 2004; Shatz e

Liscovitch, 2004) que sugere, também, a participação de LMWPTPs durante o desenvolvimento do processo.

Sendo assim, as LMWPTPs têm sido consideradas candidatas a oncogenes e potenciais alvos para o desenvolvimento de novas terapias anti-tumorais, justificando assim a necessidade e a importância de um maior conhecimento sobre suas atividades em células normais, neoplásicas e células com fenótipo de resistência a múltiplas drogas (MDR).

## **1.14. CALIXARENOS**

O nome calixareno foi sugerido por Gutsche (Gutsche, 1990), calix significa vaso e areno, presença de anéis aromáticos. Calixarenos são compostos macrocíclicos de unidades fenólicas unidas por grupos metilenos ou sulfúricos nas posições 2 e 6 orto à hidroxila (De Fátima *et al.*, 2009) (figura 5). Os calixarenos permitem a inclusão de compostos variados, o que torna os calixarenos interessantes na química supramolecular, possibilitando reconhecimento molecular, catálise, transporte de moléculas e íons metálicos. Os calixarenos apresentam alto ponto de fusão, baixa solubilidade e elevada acidez (Lazzarotto *et al.*, 1995).

Apesar de serem utilizados como plataformas para desenvolvimento de novos fármacos e como carreadores de fármacos, recentemente algumas propriedades biológicas dos calixarenos substituídos têm sido reportadas, tais como:

Atividade antiviral: Motornaya e colaboradores (2006) descreveram a síntese de aminoadamantilcalixarenos e suas propriedades antivirais. Estes compostos reduziram em torno de 1000 vezes a infecção das células de rim de macaco (Vero-B) pelo vírus da herpes (HSV-2).

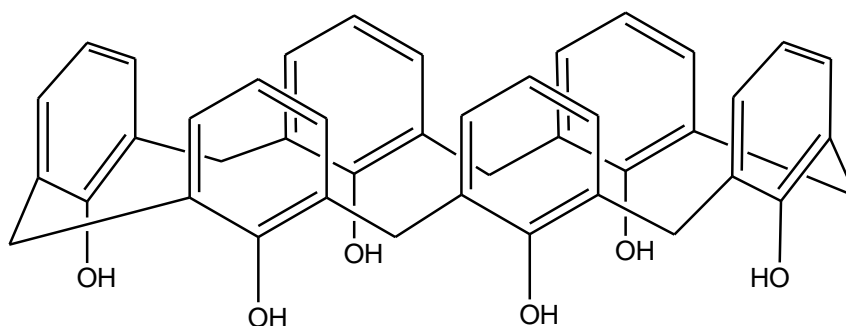


Atividade antifúngica: Paquet e colaboradores (2006) sintetizaram híbridos de calix[4]areno com anfotericina B. Esse híbrido foi testado contra *Saccharomyces cerevisiae*. A atividade antifúngica destes conjugados foi superior ou similar a anfotericina B. Importante mencionar que os híbridos mantiveram a habilidade de reter o efluxo de potássio de vesículas, sugerindo uma eficiente formação de canal para este íon na membrana, assim como com a anfotericina B. Compostos derivados de calixarenos também são promissores contra doenças causadas por fungos que afetam cereais.

Atividade antibacteriana: a atividade antibacteriana dos calixarenos foi inicialmente reportada, em 1955, por Conforth e colaboradores em tuberculose e outros modelos de micobacterioses. Outros trabalhos demonstraram que derivados de calixarenos afetam o metabolismo lipídico celular sugerindo que a atividade antimicobacteriana possa estar relacionada com a inibição de lipases e fosfolipases (Jain & Jahagirdar 1985; Hart *et al.*, 1996). Além disto, Colston e colaboradores (2004) demonstraram que o mecanismo de ação dos calixarenos para inibir o crescimento do *Mycobacterium tuberculosis* está relacionado com o metabolismo da L-arginina, e atividade óxido nítrico sintase induzível.

Atividade anti-angiogênica e antitumoral: a overexpressão do receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFR) ocorre em muitos carcinomas (Sebti e Hamilton, 2000). O fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) se liga ao PDGFR, um receptor de tirosina quinase, causando sua dimerização e consequente autofosforilação. O receptor ativado desencadeia o recrutamento de proteínas sinalizadoras capazes de ativar vias de transdução de sinais responsáveis pela proliferação, sobrevivência celular e angiogênese. Logo, o desenvolvimento de novas moléculas que sejam capazes de impedir a interação do PDGF ao PDGFR é crucial na terapia de pacientes com câncer. Vários autores têm reportado atividades anti-angiogênica e antitumoral dos calixarenos:

(Blaskovic, 2000; Sebti e Hamilton, 2000; Dings *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2006). Camundongos *nude* que tiveram células U87MG (glioblastoma humana) injetadas foram tratados diariamente com calix[4]areno. De forma interessante, foi observada inibição do crescimento tumoral nestes animais (Blaskovic MA, 2000; Sebti e Hamilton, 2000). Resultado similar foi observado com células A-549 (adenocarcinoma de pulmão humano). Importante mencionar que o tratamento diário com o calix[4]areno não causou efeitos tóxicos nos animais mesmo após um mês de administração. Devido a baixa solubilidade dos calixarenos em água, em estudos posteriores foram sintetizados uma segunda geração de derivados do calix[4]areno mais polares, mas que mantiveram a capacidade de inibir a autofosforilação do PDGFR (Zhou *et al.*, 2006). Dings e colaboradores (2006) observaram uma diminuição do crescimento do tumor de ovário (58-65%) e melanoma (42-57%) em camundongos tratados com calix[4]areno .

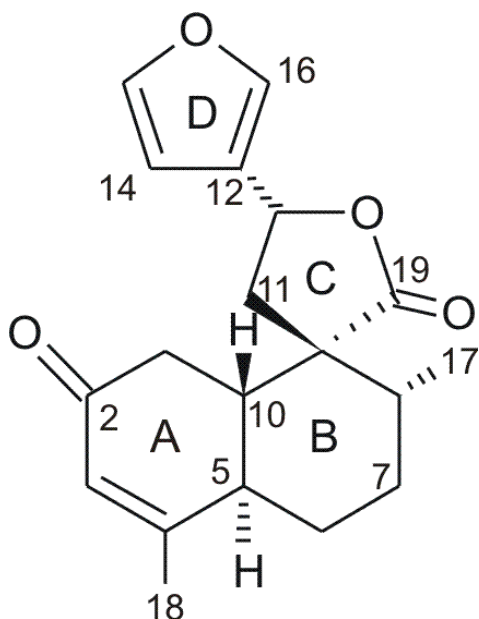


**Figura 5:** Estrutura química do calix[6]areno

## 1.15. PRODUTOS NATURAIS

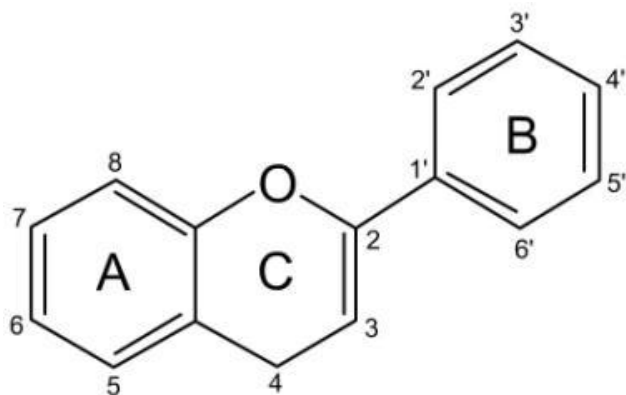
Desidrocrotonina (tDCTN): A Desidrocrotonina é um norditerpeno (lactona) extraído das cascas da *Croton cajucara* Benth, pertencente à família Euphorbiaceae, vulgarmente conhecida como sacaca, sendo encontrada

principalmente no Estado do Pará (figura 6). Nesta região, as folhas e as cascas são utilizadas na forma de chá para tratar problemas hepáticos, intestinais e também como hipoglicemiantes (Hiruma-Lima *et al.*, 2000). Outros estudos mostraram que esta lactona apresenta também atividade antiulcerogênica e antineoplásica (Souza-Brito *et al.*, 1998; Costa *et al.*, 1999; Grynberg *et al.*, 1999). Dessa forma, esta droga tem despertado grande interesse para os estudos de citotoxicidade e dos mecanismos das suas atividades biológicas (antiulcerogênia e antineoplásica), além de servir como precursor de derivados obtidos quimicamente com menor toxicidade (Rodriguez e Haun, 1999). As sesquiterpeno lactonas apresentam grupos funcionais que são responsáveis pela atividade biológica das mesmas. No caso específico da tDCTN, analisando-se sua estrutura nota-se 3 grupos funcionais altamente reativos que são:  $O=C-C=C$ , uma lactona e uma ciclopentenona. Como a estrutura da tDCTN não é plana, o grupo que está mais disponível é o  $O=C-C=C$ , o qual pode funcionar como aceptor de Michael, podendo sofrer ataque nucleofílico pelo grupamento SH de algumas proteínas, da glutathiona reduzida e também do nitrogênio 7 da guanina (Costa *et al.*, 1999).



**Figura 6:** Estrutura química da Desidrocrotonina (tDCTN)

Flavonóides - são compostos exclusivamente produzidos por plantas. Atualmente existem cerca de 6.500 tipos de flavonóides com estruturas e atividades biológicas conhecidas, os quais são divididos em diferentes classes: antocianinas, flavanas, flavononas, flavonas, flavonóis e isoflavonóides. Estruturalmente estes flavonóides são caracterizados pelo esqueleto carbônico C6-C3-C6 o qual pode ou não apresentar uma porção glicídica (Peterson e Dwyer, 1998; Harborne e Williams, 2000) (figura 7). Grande atenção tem sido dada às atividades biológicas dos flavonóides relacionadas à saúde de mamíferos, os quais agem como: antialérgicos, antiinflamatórios, antihepatotóxicos, antidiabéticos, analgésicos, antiaterogênicos e antitumorais (Di carlo, *et al.*, 1999; Galati e O'Brien, 2004). Estas atividades biológicas dos flavonóides estão relacionadas basicamente com a ação antioxidante e atividade inibitória sobre diferentes enzimas (quinases e topoisomerases) (Harborne e Williams, 2000; Ferguson, 2001; Havsteen, 2002).



**Figura 7:** Estrutura química dos flavonóides

## **Mecanismos de ação dos flavonóides**

Nitrosilação - alguns flavonóides, como campferol, quercetina, catequina e naringina podem participar de reações de nitrosilação, podendo apresentar atividade mutagênica (Pignatelli *et al.*, 1980).

Pró-oxidantes - os flavonóides de maneira geral atuam como antioxidantes em altas doses e alguns desses compostos podem agir como pró-oxidantes na presença do ácido nítrico (Ferguson, 2001). Sahu e Gray (1997) demonstraram que morina e naringenina causaram danos no DNA e membranas de hepatócitos de ratos por produzirem radical hidroxil. Ong e Koo (1997) demonstraram que a miricetina causou degradação do DNA *in vitro*, cujo efeito foi aumentado na presença de  $\text{Fe}^{3+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$ .

Síntese e reparo do DNA - os flavonóides podem afetar a síntese do DNA indiretamente (ligando-se à metais) ou diretamente (alterando a estrutura do DNA). A quercetina provocou inibição (dose-dependente) da síntese de DNA em células HL60 (Kang e Liang, 1997). Abalea e colaboradores (1999) demonstraram que a miricetina induziu reparo do DNA em hepatócitos de ratos tratados com ferro. Análise da expressão da DNA polimerase revelou que houve um aumento da expressão desta enzima nos hepatócitos tratados com a miricetina, o que pode ser a causa da indução do reparo por este flavonóide.

Apoptose - vários flavonóides são capazes de induzir apoptose em diferentes tipos celulares, o que ocorre de acordo com a estrutura do flavonóide e do tipo celular. As células tumorais podem desencadear o processo de apoptose quando tratadas com concentrações de flavonóides de 1-100 mM (Ferguson, 2001), isso parece estar relacionado com a liberação do citocromo C da mitocôndria para o citosol (Wang *et al.*, 1999). Além disto, Kong e colaboradores (2000) demonstraram que baixas concentrações de flavonóides podem ativar proteínas quinases ativadas por mitógenos, levando à expressão de genes responsáveis pela sobrevivência de várias linhagens de células de mamíferos (cFos e c-Jun) e que concentrações

altas e suprafarmacológicas destes compostos levam à apoptose e necrose, respectivamente.

Inibição de enzimas - vários estudos têm demonstrado inibição de enzimas mitocondriais, xantina oxidase, glutathione redutase e enzimas envolvidas na transdução de sinal (proteína quinase C, fosfatidilinositol 3-quinase e fosfatidilinositol 4-quinase) por flavonóides (Kang e Liang, 1997; Zhang *et al.*, 1997; Gamet-Payrastre *et al.*, 1999).

Antitumoral - os flavonóides são considerados como quimopreventivos do câncer por atuarem como antioxidantes, moduladores da atividade de enzimas e induzirem o reparo do DNA, como mencionado acima. Estes compostos podem afetar a proliferação, diferenciação e apoptose de diversas linhagens de células tumorais (Di Carlo *et al.*, 1999). A chalcona apresentou forte efeito citotóxico sobre células tumorais de pulmão, cólon humano e leucemia murina. O campferol e a quercetina apresentaram atividades moduladoras da proliferação das células HL60 (Kang e Liang, 1997). O mecanismo de ação da atividade antitumoral dos flavonóides ainda não está bem elucidado, alguns autores têm correlacionado este efeito com a inibição de proteínas tirosina quinases; a quercetina inibe a proteína quinase C, enzima chave na regulação da proliferação celular (Kang e Liang, 1997). Wenzel e colaboradores (2000) demonstraram que uma flavona induziu a diferenciação e apoptose de células do câncer de cólon humano, cujo mecanismo proposto foi a alteração da expressão de genes relacionados com o ciclo celular e apoptose, incluindo o NFkB e Bcl-X.

Antioxidante - a ação antioxidante é uma das mais conhecidas ações dos flavonóides, os quais impedem a peroxidação lipídica, danos no DNA e inibem a proliferação celular. Este efeito está associado à capacidade destes compostos de sequestrarem radicais livres (ânion superóxido, radicais hidroxil e peroxil). Além disso, alguns flavonóides (apigenina e genisteína) interagem com receptores nucleares e induzem a síntese da glutathione S-transferase e outras enzimas antioxidantes e inibem enzimas que apresentam atividade oxidante (citocromo P450 e ciclooxigenase) (Harborne e Williams, 2000; Ferguson, 2001). A

capacidade dos flavonóides de se ligarem a metais (ferro/cobre) pode impedir a produção de radicais hidroxil pelas reações de Fenton e Haber-Weiss (Thompson e Williams, 1976). Estes mecanismos que conferem à alguns flavonóides a ação antioxidante são responsáveis pela modulação de vários processos celulares envolvendo reações redox, incluindo regulação da atividade das proteínas tirosina fosfatases (Gamet-Payraastre *et al.*, 1999).

Diminuição da fluidez da membrana: A diminuição da fluidez da membrana pelos flavonóides é outro mecanismo que contribui para a ação protetora destes compostos sobre as membranas (Arora *et al.*, 2000). Por o outro lado, Bestwick e Milde (2001) demonstraram que a quercetina apresentou um efeito protetor parcial contra o estresse oxidativo induzido pela menadiona em células HL60. Foi observado efeito protetor sobre danos no DNA, no entanto, não houve proteção da peroxidação da membrana.

## **1.16. ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ROS)**

O papel do estresse oxidativo no câncer é objeto de estudo há anos, e é consenso na literatura que as ROS levam a lesões no DNA e mutações (Rodrigues *et al.*, 2008). As ROS são formadas em células normais em resposta a vários estímulos tais como: radiação UV, fatores de crescimento hematopoiéticos, como interleucina-3 (IL3), fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) (Sattler *et al.*, 1999). A transformação de células hematopoiéticas pelo oncogene tirosina quinase BCR-ABL1 está associada com o aumento crônico de ROS intracelular (Rodrigues *et al.*, 2008).

Suh e colaboradores (1999) demonstraram que o aumento da produção de ROS pode levar a transformação fenotípica. Na indução direta de ROS através da via mitocondrial, os níveis de ROS podem ser regulados indiretamente através de diferentes vias. Grupamentos tióis presentes na glutathiona (GSH) ou tireodoxina, reduzem ROS e possibilitam que o estímulo do crescimento de células

hematopoiéticas afetem a atividade de uma ou mais dessas vias (Wood *et al.*, 2003). Porém os organismos aeróbicos desenvolveram um complexo sistema de defesa antioxidante contra os efeitos prejudiciais das ROS, bem como também promovem a ação destas sobre vias de sinalizações (Piccoli *et al.*, 2007). A partir do radical ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), a superóxido dismutase (SOD) gera  $H_2O_2$  que é reduzido a  $H_2O$ . A glutathione peroxidase reduz peróxidos, utilizando a glutathione reduzida (GSH) como doadora de elétrons e gerando a forma oxidada da glutathione (GSSG) (Wood *et al.*, 2003). A razão entre a GSH e a GSSG é bom indicador do estado redox intracelular. A glutathione redutase que tem como coenzimas o NADH e  $FADH_2$  (Rivlin R.S, 1996), ajuda a manter os níveis de glutathione (GSH) que é um protetor contra os efeitos deletérios dos radicais livres (Bray e Taylor, 1993).



## **OBJETIVOS**

## **2. OBJETIVOS**

O presente trabalho teve como objetivo geral identificar mediadores moleculares relacionados com a sobrevivência e resistência das células leucêmicas; e utilizar produtos naturais e sintéticos para induzir morte destas células. Neste contexto foram traçados os seguintes objetivos específicos:

### **Capítulo 1**

- Avaliar o efeito do calix[6]areno na viabilidade celular das células da leucemia mielóide crônica humana (K562 e Lucena-1);
- Identificar o tipo de morte induzida nestas células pelo calix[6]areno;
- Identificar os principais alvos moleculares afetados pelo calix[6]areno.

### **Capítulo 2**

- Analisar o papel da proteína tirosina fosfatase de baixo peso molecular (LMWPTP) na resistência das células leucêmicas;
- Avaliar a sensibilidade das células leucêmicas frente a quimioterápicos após o silenciamento da LMWPTP;
- Identificar possíveis vias relacionadas com a LMWPTP.

### **Capítulo 3**

- Avaliar o efeito de produtos naturais na proliferação das células da leucemia mielóide aguda (HL60);
- Identificar o tipo de morte celular induzido por esses compostos;
- Examinar o efeito desses compostos no estado redox celular;
- Avaliar o potencial desses compostos na indução da diferenciação das células leucêmicas.

# **CAPÍTULO 1**

## CAPÍTULO 1

### **Antiproliferative action of calix[6]arene on erythroblastic leukemia cells**

Paula Anastácia Ferreira<sup>a</sup>, Roberta Regina Ruela-Sousa<sup>b</sup>, Ângelo de Fátima<sup>c</sup>, Fabiano Souza Reis<sup>c</sup>, Cláudia de Lourdes Soraggi<sup>a</sup>, Maikel P. Peppelenbosch<sup>b</sup> and Carmen Veríssima Ferreira<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Laboratory of Biossays and Signal Transduction, Biochemistry Department, Biology Institute, University of Campinas (UNICAMP), C.P. 6109, CEP 13083-970, Campinas, SP, Brazil.

<sup>b</sup>Department of Cell Biology, University Medical Center Groningen, University of Groningen, Groningen, The Netherlands.

<sup>c</sup>Group of Studies in Organic and Biological Chemistry (GEQOB), Chemistry Department, Accurate Science Institute, Federal University of Minas Gerais (UFMG) Campus Pampulha, C.P. 6627, CEP 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brazil.

**\*Corresponding author:** Carmen V. Ferreira (PhD), Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), C.P. 6109, CEP 13083-970, Campinas, SP, Brazil. Tel: +55-19-3521-6659; Fax: 55-19-3521-6129; E-mail address: [carmenv@unicamp.br](mailto:carmenv@unicamp.br)

## Abstract

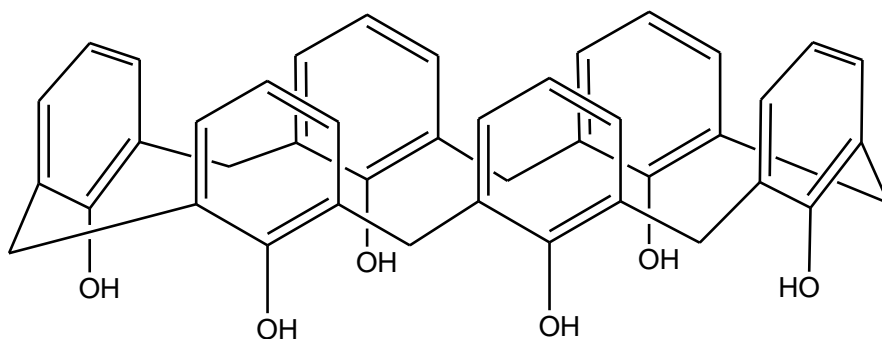
Beyond the side effects of antitumor agents, the multidrug resistance (MDR) limits the efficacy of continuous chemotherapeutic treatment. In this work, we evaluated the effect of calix[6]arene on K562 cells and its vincristine-resistant counterpart, Lucena-1, a P-Glycoprotein-overexpressing subline. Calix[6]arene displayed an  $IC_{50}$  value ranging 1-5  $\mu$ M for K562 cells and 5-10  $\mu$ M for Lucena-1 cells. Interestingly, this compound did not affect normal human lymphocyte viability. Also we examined the effect of calix[6]arene on the expression of survival and antiproliferative proteins. Our findings revealed that calix[6]arene induces apoptosis signaling on both K562 and Lucena-1 cells as molecularly demonstrated by increasing Bax/Bcl-2 ratio and PARP cleavage. Accordingly, optical microscopy indicates apoptotic cells, after calix[6]arene treatment. It was determined that calix[6]arene induced cell cycle arrest in both leukemic cells. Protein tyrosine phosphatase PTEN from leukemia cells was more active in the presence of calix[6]arene. Accordingly, the protein kinase Akt, related to survival and proliferation, was inhibited in cells treated with calix[6]arene. Transformation of BCR-ABL suggest induction of elevated levels of intracellular ROS. In this study we reported an enhanced expression of antioxidant enzymes. In addition, no effect on P-Glycoprotein activity was detected. Therefore, this study supports further examination of calix[6]arene as a potential agent for conquering cancer cells resistance.

**Keywords:** Antiproliferative; Calix[6]arene and Leukemia.

## Introduction

Resistance to chemotherapy is a major drawback in the effective treatment of leukemia. Although initially most of the leukemias react favourably to chemotherapy, the chemotherapeutic treatment outcome of most adult acute myeloid leukemia remains unacceptable. The major problem here is the build-up of resistance against therapy. The processes that are associated with acquisition of therapy resistant phenotype remain only partially understood but involve overexpression of transporters (e.g. P-Glycoprotein), induction of autophagy, activation of the biotransformation enzymatic complex and an increase of intracellular vesicle trafficking (Dean *et al.*, 2005; Higgins, 2007). In this context, the identification of new compounds which are able to diminish the proliferation rate of leukemia resistant cells are desirable. In this study we examined the molecular effect of calix[6]arene on p210-BCR-ABL chronic myelogenous leukemia cell line K562 (drug-sensitive), and its resistant counterpart (Lucena-1), a well-established model of chemotherapy resistance in erythroleukemia. Calixarenes are macrocyclic compounds of phenolic units linked by methylene or sulfur groups at the 2,6-positions (de Fatima *et al.*, 2009). Besides being used as platform for the design and development of new drugs and as a carrier of effective compounds, recently some important biological properties of calixarenes such as antiviral (Motornaya *et al.*, 2006); antimycobacterial (Colston *et al.*, 2004); antifungal (Paquet *et al.*, 2006); antiangiogenic and antitumoral (Blaskovic, 2000; Sebt e Hamilton, 2000; Dings *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2006) have been reported.

In this present study we observed that calix[6]arene (Figure 1) induces apoptosis of both K562 and Lucena-1 cells as demonstrated by the increased Bax/Bcl-2 ratio and PARP cleavage. Protein tyrosine phosphatase PTEN from leukemia cells was significantly more active by calix[6]arene. Accordingly, the protein kinase Akt was inhibited in cells treated with calix[6]arene. Importantly, we observed some differences in the molecular action of this compound on both cell lines. For instance, AIF (apoptosis inducing factor) expression was increased in K562 cells and decreased in Lucena-1 cells.



**Figure 1:** Chemical structure of calix[6]arene

Skorski and collaborators (1995) reported that activation of the PI3K pathway is important for transformation by BCR-ABL1. This transformation is associated with elevated levels of intracellular reactive oxygen species. ROS have been implicated in processes that promote viability, cell growth and regulation of other biological functions such as migration of cells or gene expression. Consequently, ROS are involved in the pathogenesis of many different types of cancer (Rodrigues *et al.*, 2008). Aerobic organisms developed a complex network of antioxidant defense system as a protection against harmful effects of ROS as well as to promote a transient action of ROS on signal transduction pathways (Piccoli *et al.*, 2007). In the present study we observed an enhanced expression of some antioxidant enzymes after treatment with calix[6]arene. In addition, no effect on P-Glycoprotein activity was detected. This study supports further examination of calix[6]arene as a potential agent for conquering cancer cells resistance.

## **Materials and methods**

### **Cell line and Reagents**

K562 cells were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD) and the resistant cell line Lucena-1 was produced as described previously (Rumjanek *et al.*, 2001). Anti-rabbit, anti-goat and anti-mouse peroxidase-conjugated antibodies were purchased from Cell Signaling Technology (Beverly, MA). Antibodies against AIF, Bcl-2, Bax, c-Myc, pro-caspase 3, GAPDH and  $\beta$ -actin were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). p-PTEN, p-Akt, Akt, SOD, catalase, GPX and GR antibodies were from Abcam. PTEN and MnSOD were from Sigma.

### **Cell Culture**

K562 and Lucena-1 cells were routinely grown in suspension in RPMI 1640 medium supplemented with 2 mM glutamine, 100 IU/mL penicillin, 100  $\mu$ g/mL streptomycin and 10% heat-inactivated fetal bovine serum, at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> humidified atmosphere. In the Lucena-1 culture medium vincristine 60nM was routinely added (Rumjanek *et al.*, 2001).

Peripheral blood collected from healthy donors was diluted 1:1 with non-supplemented RPMI medium and centrifuged on a hystopaque gradient for 30 min (1.500 rpm). Lymphocytes were collected and resuspended in RPMI 1640 supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 IU of penicillin/mL and 100mg of streptomycin/mL and plated at density of  $1 \times 10^6$ /mL in 24-well plates. Cells were cultured in a humidified incubator with a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere at 37°C for 48 h, after which the medium was removed and replaced with medium containing calix[6]arene. Lymphocytes viability was assessed by MTT assay.

### **K562 and Lucena-1 treatment**

Cells were plated at  $1 \times 10^5$  cells/mL and treated with calix[6]arene for 24 h. After treatment the cell viability was assessed by trypan blue dye exclusion (Renzi



*et al.*, 1983) and the MTT reduction assays as previously described (Mosmann, 1983).

### **Western blotting analysis**

Cells ( $3 \times 10^7$ ) were lysed in 200  $\mu$ L of lysis buffer (50 mM Tris–HCl pH 7.4), 1% Tween 20, 0.25% sodium deoxycholate, 150 mM NaCl, 1 mM EGTA, 1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 1 mM NaF and protease inhibitors (1  $\mu$ g/mL aprotinin, 10  $\mu$ g/mL leupeptin, and 1 mM 4-(2-aminoethyl) benzenesulfonyl-fluorid-hydrochloride) for 2 h on ice. Protein extracts were cleared by centrifugation and protein concentrations were determined using the Lowry method (Hartree, 1972). Twice the volume of SDS gel loading buffer (100 mM Tris–HCl pH 6.8), 200 mM DTT, 4% SDS, 0.1% bromophenol blue and 20% glycerol was added to samples which were subsequently boiled for 5 min. Cell extracts were resolved by SDS-polyacrylamide gel (12%) electrophoresis (PAGE) and transferred to nitrocellulose membranes. Membranes were blocked in 5% fat-free dried milk or bovine serum albumin in Tris-buffered saline-Tween 20 (0.1%) and incubated overnight at 4°C with the appropriate primary antibody at 1:1000 dilution. After washing in TBS-Tween 20 (0.1%), membranes were incubated with anti-rabbit, anti-mouse and anti-goat horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies, at 1:5000 dilutions, in blocking buffer for 1h. Proteins were detected using enhanced chemiluminescence.

### **Effect on Rhodamine 123 accumulation by calix[6]arene**

To measure P-Gp activity, the substrate Rhodamine 123 was used. For this  $1 \times 10^5$  cells were treated with calix[6]arene for 24 h. Subsequently, cells were further incubated for 30 min in the presence of 200 ng/mL Rhodamine 123 with or without P-Gp inhibitor (5  $\mu$ M verapamil). Afterwards cells were washed with PBS and left at 37°C for a further 1 h with or without the inhibitor, washed, again suspended in cold PBS and kept on ice. Rhodamine fluorescence was subsequently assessed by flow cytometric analysis of cell within the live-gate, using a FACScalibur (Becton and Dickinson, USA). The data were analyzed by WinList.

### **Flow cytometry for apoptosis analysis**

To perform the Annexin and PI assays, the FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit II from BD Pharmingen (Breda, The Netherlands) was used. Briefly, control and calix[6]arene treated cells were collected, washed twice in cold PBS, resuspended in binding buffer (provided in the kit), and stained with Annexin V FITC and PI.

### **Flow cytometry for cell-cycle analysis**

After treatment with calix[6]arene, cells were spun down, washed with PBS, and resuspended in work solution (0.96 g/mL sodium citrate, 1 mg/mL ribonuclease A, 0.02 mg/mL PI, 0.01% Triton X-100). After incubation in the dark for 60 min at room temperature, the samples were analyzed using FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences).

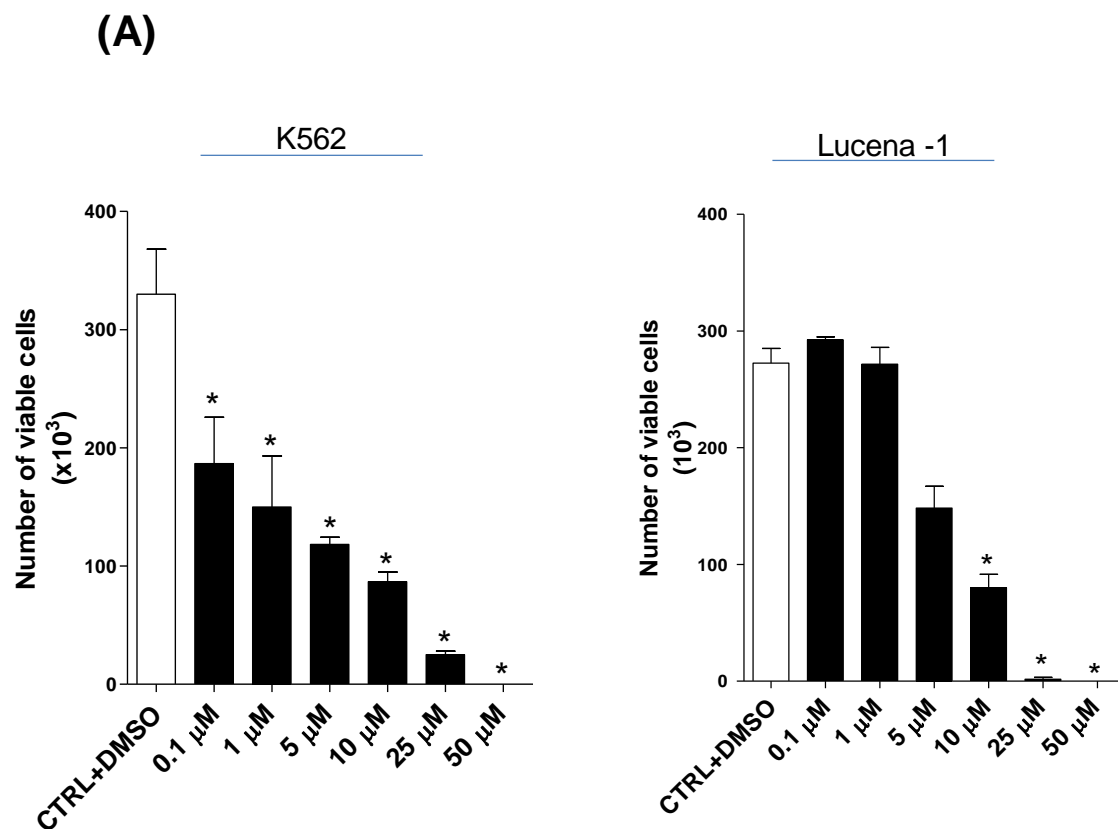
### **Statistical analysis**

All experiments were performed in triplicate and results were shown in the graphs as the means  $\pm$  S.D.M. Soluble lysates were matched for protein content and analysed by Western blotting. Analysis of immunoblotting band density was performed with the Scion Image® software (Frederick, MD, USA). All bands were compared with their respective internal control. Differences were analyzed using a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferoni post test compared the group control relationship treaty group. (\*) p values < 0.05 were considered significant. All data were analyzed using GraphPad Prism Software, Version 5.0.

## Results

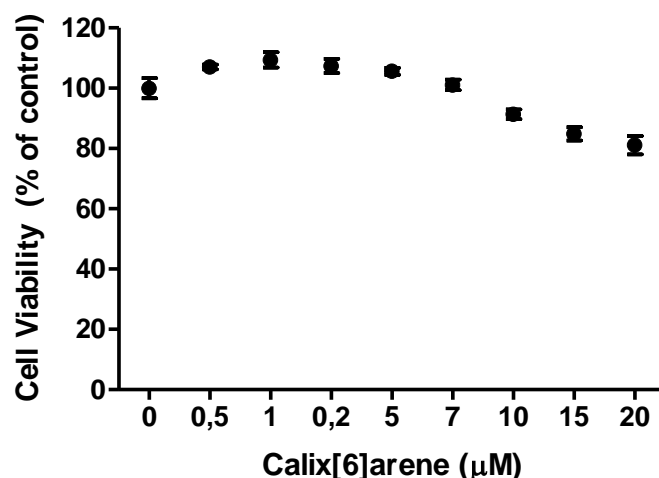
### **Evaluation of the effect of calix[6]arene on leukemia cells growth and normal human lymphocyte viability**

Erythroleukemic cell line K562 and its vincristine-resistant derivative cell Lucena-1 were treated with calix[6]arene at concentrations up to 50  $\mu\text{M}$  and its cytotoxic effect was determined employing the tripan blue exclusion method. As shown in figure 2 (A), calix[6]arene promoted a dose dependent decrease of cell number displaying an  $\text{IC}_{50}$  value ranging 1-5  $\mu\text{M}$  for K562 cell line and 5-10  $\mu\text{M}$  for Lucena-1 cell line. To establish the specificity of calix[6]arene action on leukemia cells we checked, in parallel, the effect of this compound on normal human lymphocytes viability using the MTT assay. Interestingly, human lymphocyte viability remained unchanged, even in the presence of calix[6]arene at concentrations up to 20  $\mu\text{M}$  in figure 2 (B). These results suggest that calix[6]arene can be an interesting candidate for cancer treatment.



**Figure 2 (A):** Calix[6]arene induces toxic effects in leukemia cells. Cells were treated with different concentrations of calix[6]arene (0,1, to 50  $\mu$ M) for 24 h and viability was determined by trypan blue exclusion assay. The experiment was performed in a 96 wells plate and results represent the means  $\pm$  S.D.M of 3 experiments run in triplicate (\*  $p < 0.05$ ).

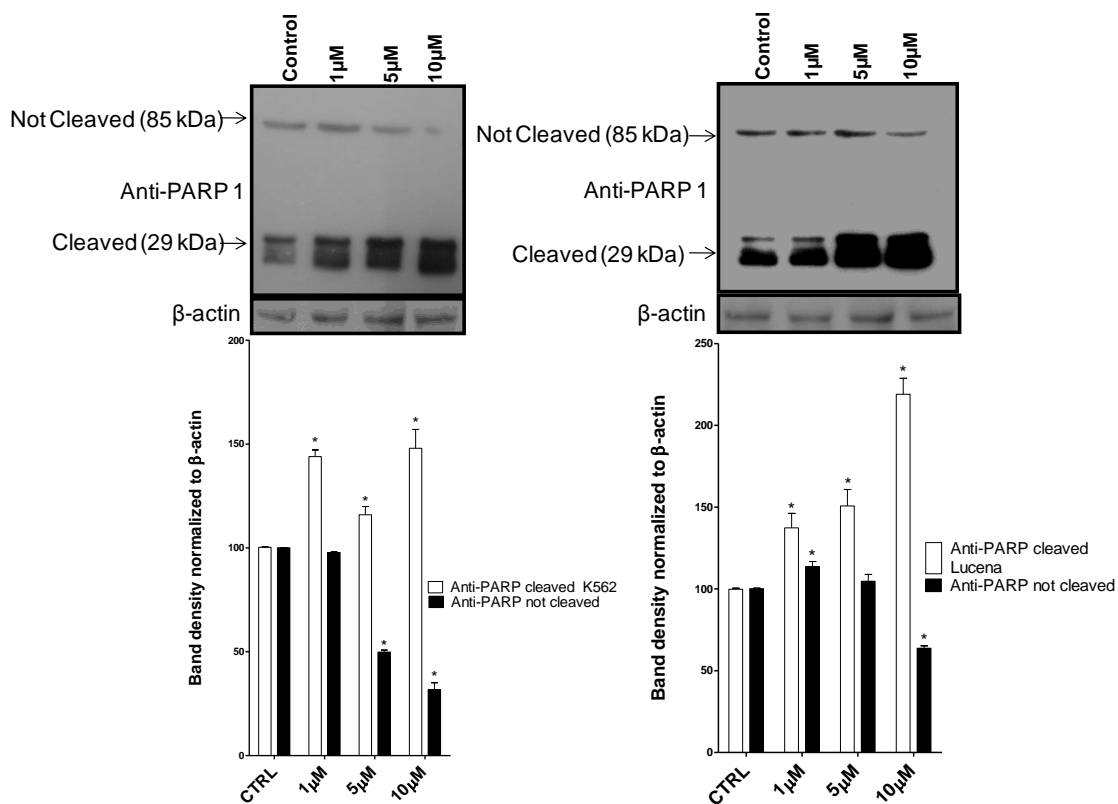
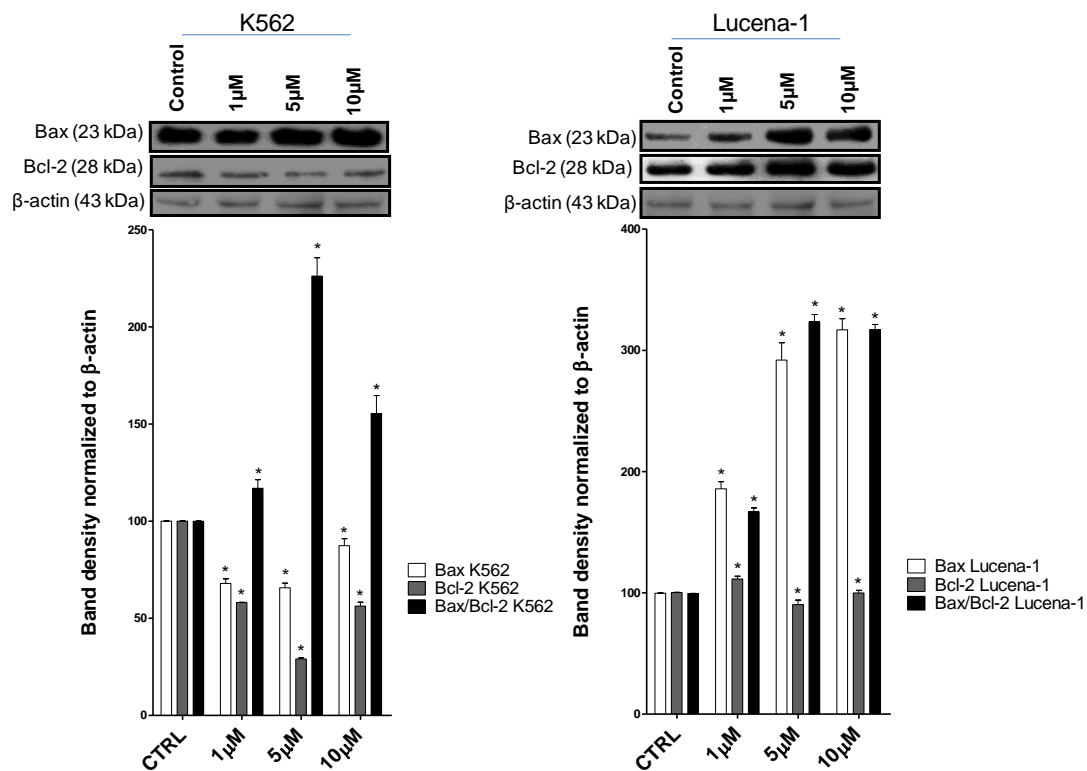
(B)

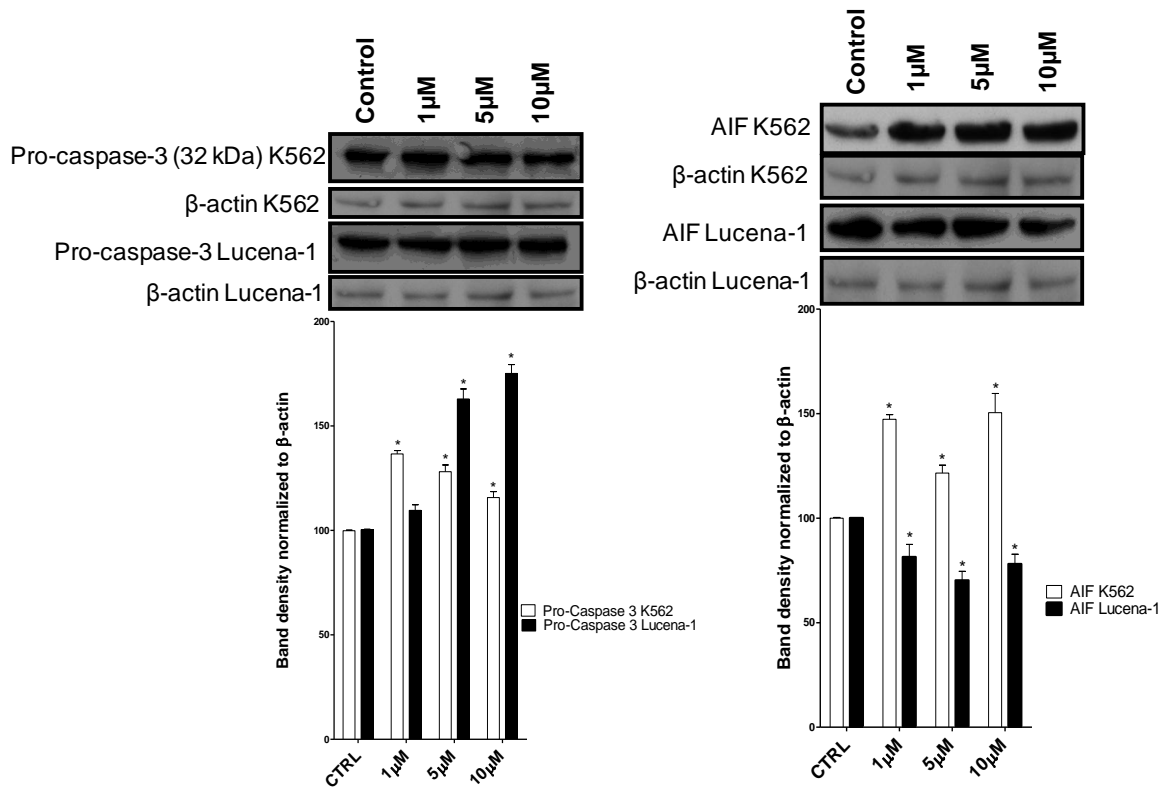


**Figure 2(B)** : Calix[6]arene is not toxic for normal human lymphocytes. Cells were treated with different concentrations of calix[6]arene (0-20  $\mu$ M) for 24 h and the viability was determined by MTT assay. Results represent the means  $\pm$  S.D.M of 3 experiments run in triplicate ( $p < 0.05$ ).

### Calix[6]arene induces apoptosis of leukemia cells

The next series of experiments were set to determine whether treatment of K562 and Lucena-1 cells with calix[6]arene led to apoptosis. Calix[6]arene was able to induce apoptosis signaling in both cell lines, as demonstrated by the increased cleavage of Poly ADP-ribose polymerase-1 (PARP-1), pro-caspase 3 expression and increased Bax/Bcl.2 ratio in Figure 3 (A, B and C). Intriguingly, apoptosis-inducing factor (AIF) expression on the two leukemia cell lines was differently affected by calix[6]arene. AIF level from K562 cells increased after treatment with calix[6]arene. However, in Lucena-1 a decrease of AIF expression was observed in figure 3 (C).



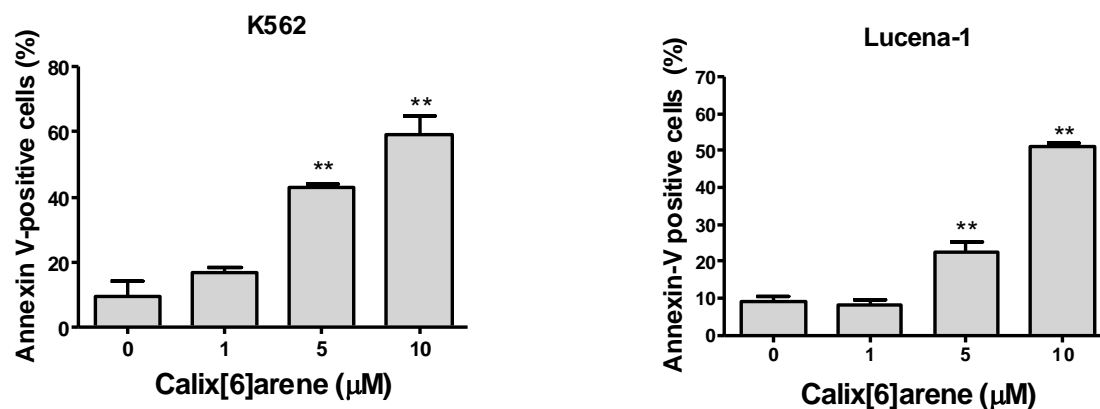


**Figure 3:** Calix[6]arene induces apoptosis of leukemia cells. Western blotting analysis was performed to assess different proteins involved in cell death cascades. Analysis of immunoblotting band density was performed with the Scion Image® software (Frederick, MD, USA). All bands were compared with their respective internal control.

### Induction of apoptosis and cell cycle arrest in K562 and Lucena- 1 cells

Annexin V/PI assay was used to detect apoptosis in K562 and Lucena-1 cells. As shown in figure 4, calix[6]arene induced a dose-dependent increase in annexin V positive cells in leukemia cells. As shown in figure 5 the optical microscopy indicated apoptotic cells, showing the apoptotic bodies. Cell-cycle analysis through flow cytometric studies were performed to determine if the antiproliferative effects of calix[6]arene involved growth arrest at specific phases of the cell cycle. K562 and Lucena-1 cells were exposed to 1, 5 and 10 μM calix[6]arene for 24 h. The percentage of cells in each phase (G0/G1, S and G2/M) of the cell cycle was calculated by flow cytometric analysis. Calix[6]arene

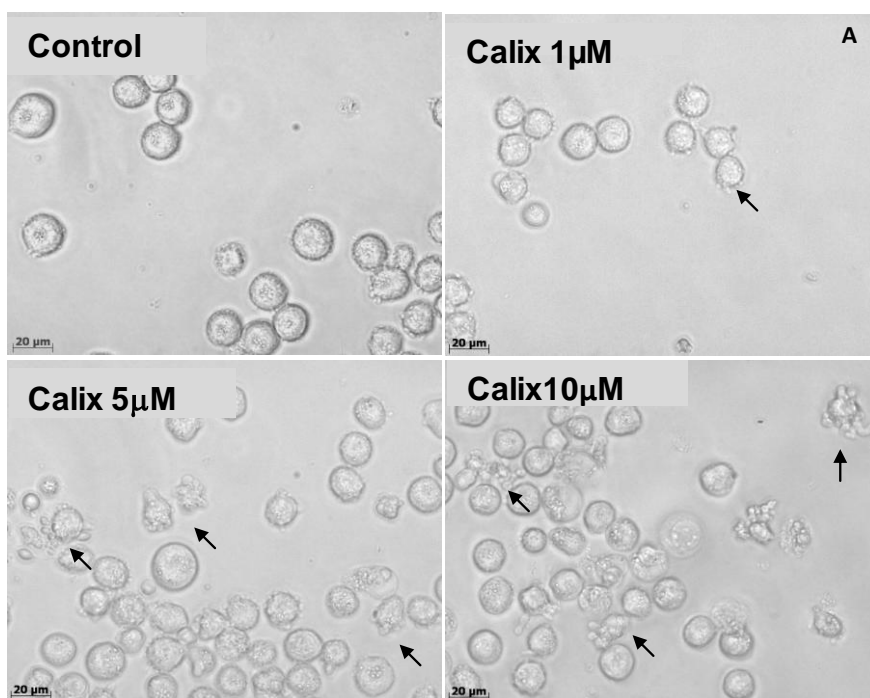
induced the inhibition of cell growth and cell cycle progression mainly by inducing arrest of the G1 phase for both cells (Figure 6).



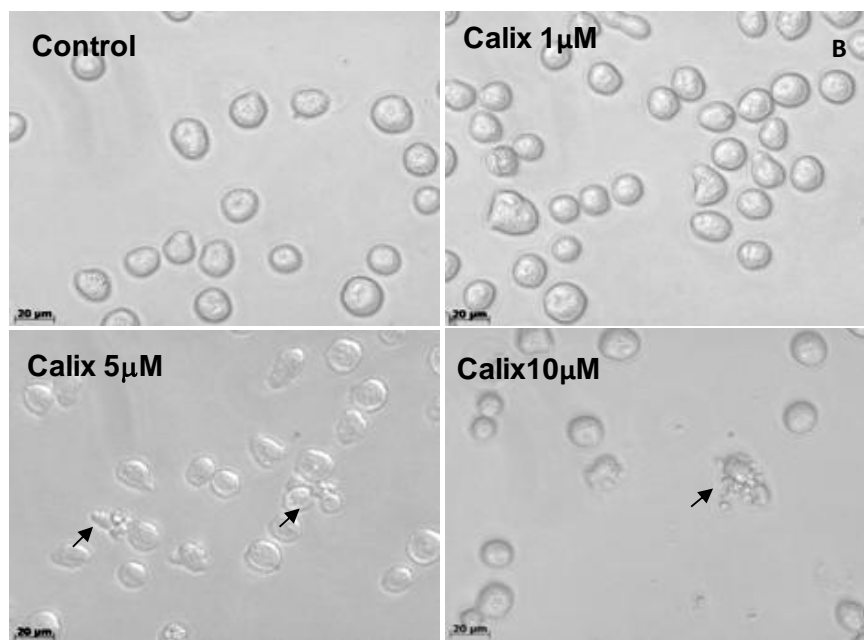
**Figure 4:** Analysis of calix[6]arene-induced apoptosis in K562 and Lucena-1 cells. After 24h of treatment with calix[6]arene (1, 5 and 10  $\mu$ M) the type of cell death induction was determined using flow cytometric analysis. Annexin V positive cells include those cells which are Annexin-V positive (early apoptotic cells) and both annexin V and PI positive cells (late apoptosis). One Way ANOVA and post-test were applied to analyze the statistic difference between the treatments and control (\*\*p < 0.01).



**(A) K562**

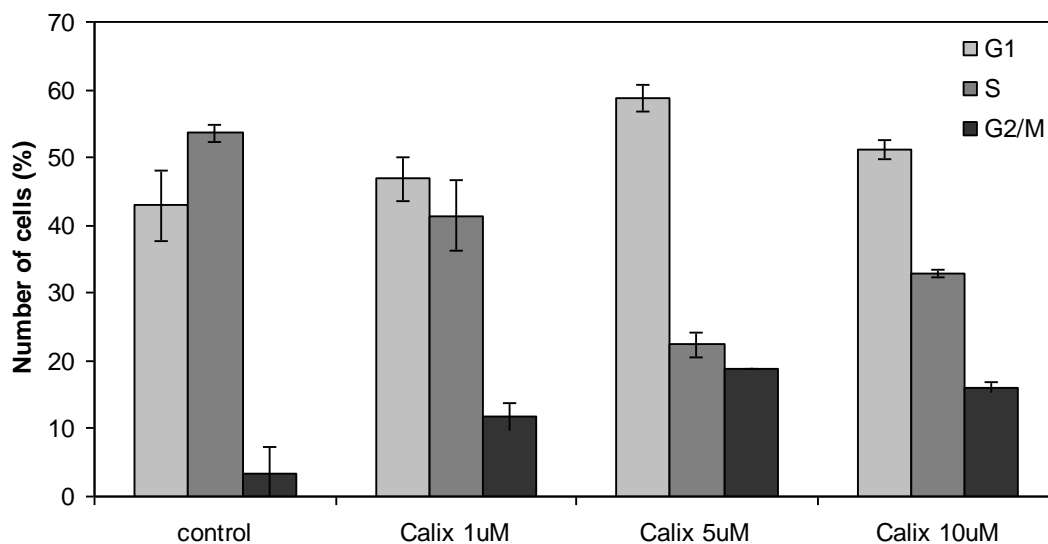


**(B) Lucena-1**

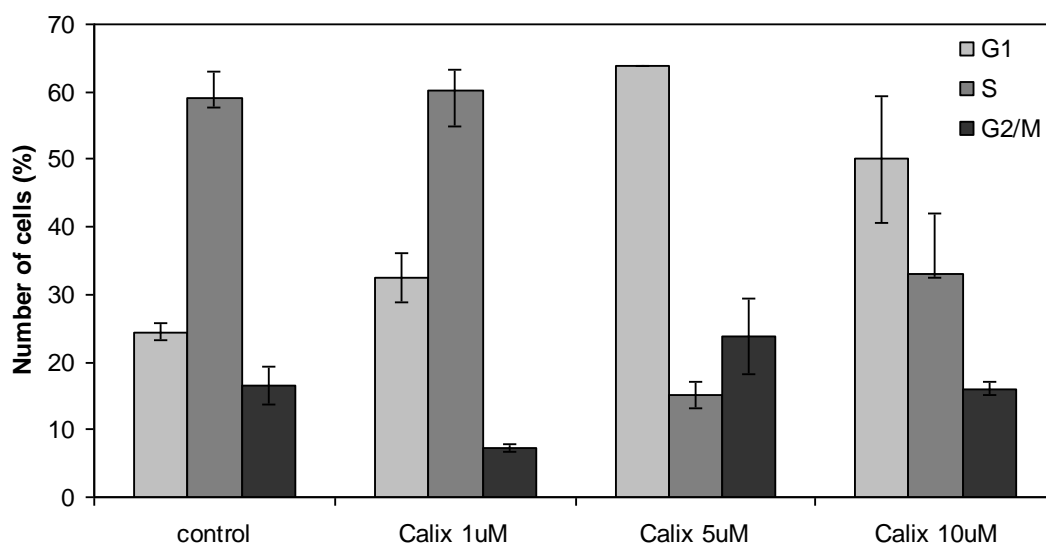


**Figure 5:** Optical microscopy of K562 **(A)** and Lucena-1 **(B)** treated with calix[6]arene 1, 5 and 10 μM for 24 h. The arrows indicate apoptotic cells, showing the apoptotic bodies attached to the cells, or close to them.

**(A) K562**



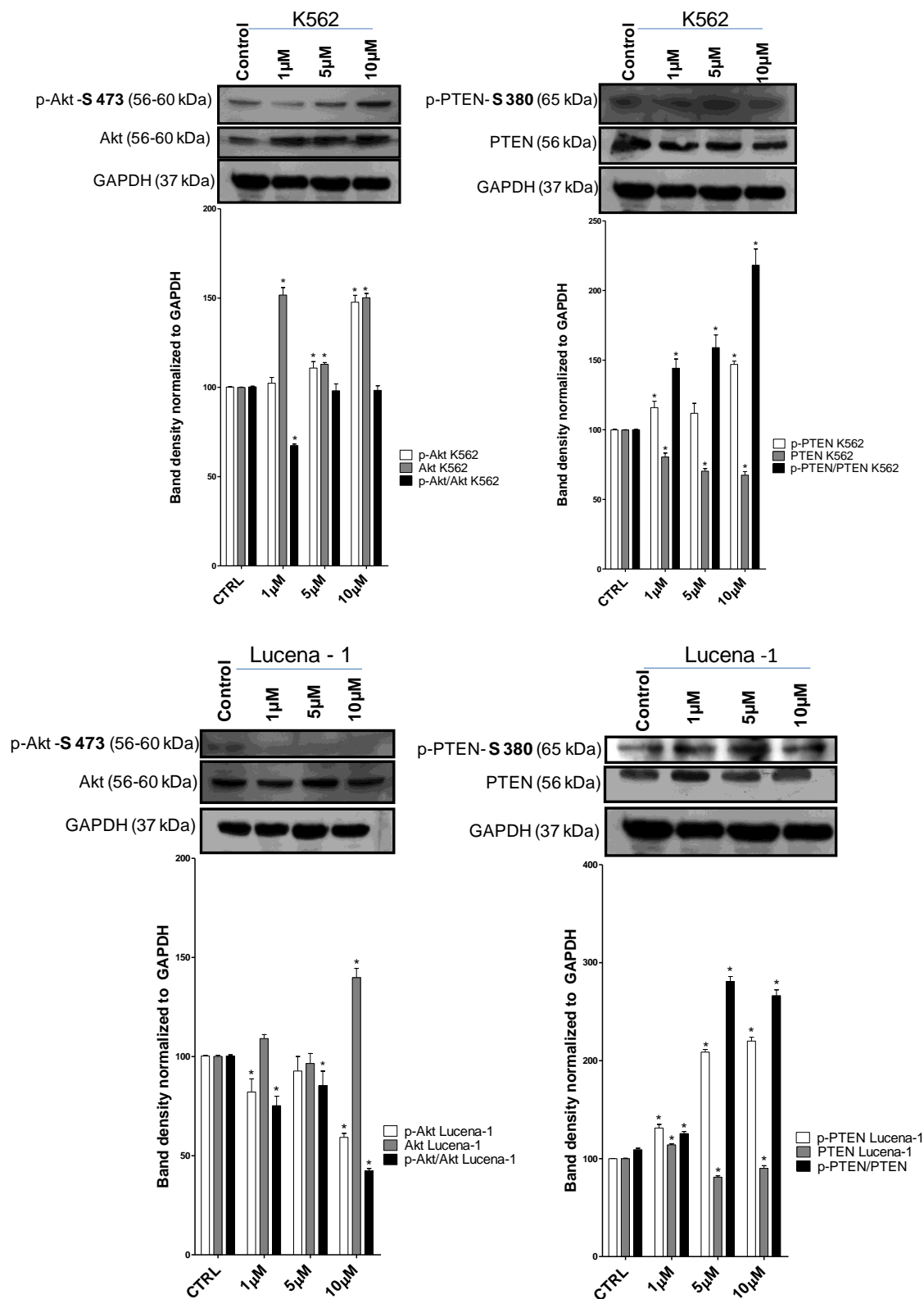
**(B) Lucena**



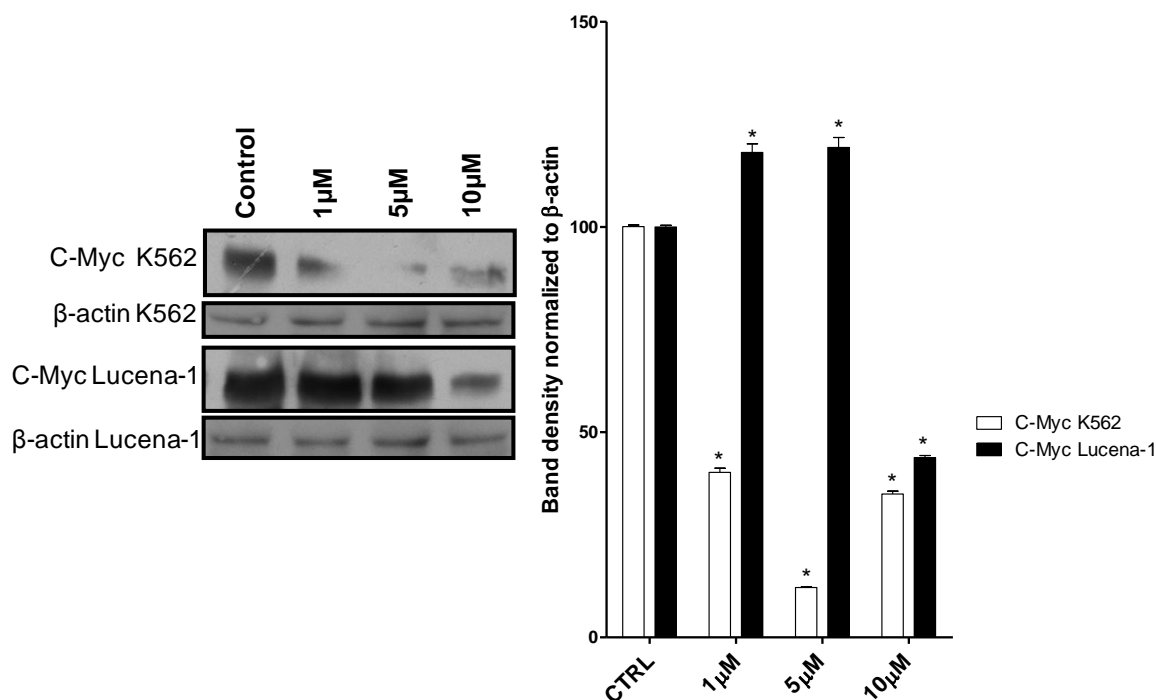
**Figure 6:** Calix[6]arene induces cell cycle arrest. Number of cells (A. K562; B. Lucena-1) in different phases of cell cycle (G0/G1 phase, S phase and G2/M) was determined by propidium iodide staining followed by flow cytometry analysis after treatment with specified concentrations of calix[6]arene for 24 h.

### **Calix[6]arene treatment impairs leukemia cells survival**

As shown in figure 7 (A and B), leukemia cells treatment with calix[6]arene provoked an inhibition of Akt and activation of PTEN. This result indicated that calix[6]arene should produce a decrease on the survival of these cells. Accordingly, calix[6]arene treatment led to downregulation of c-Myc expression (figure 8). These results indicated that calix[6]arene impairs leukemia cells proliferation by modulating survival and proliferation signaling cascades.



**Figure 7:** Protein kinase Akt activity and protein tyrosine phosphatase are modulated by calix[6]arene. Expression (Akt and PTEN) and phosphorylation status (p-Akt and p-PTEN) of densitometric analysis of band was compared with their respective internal control

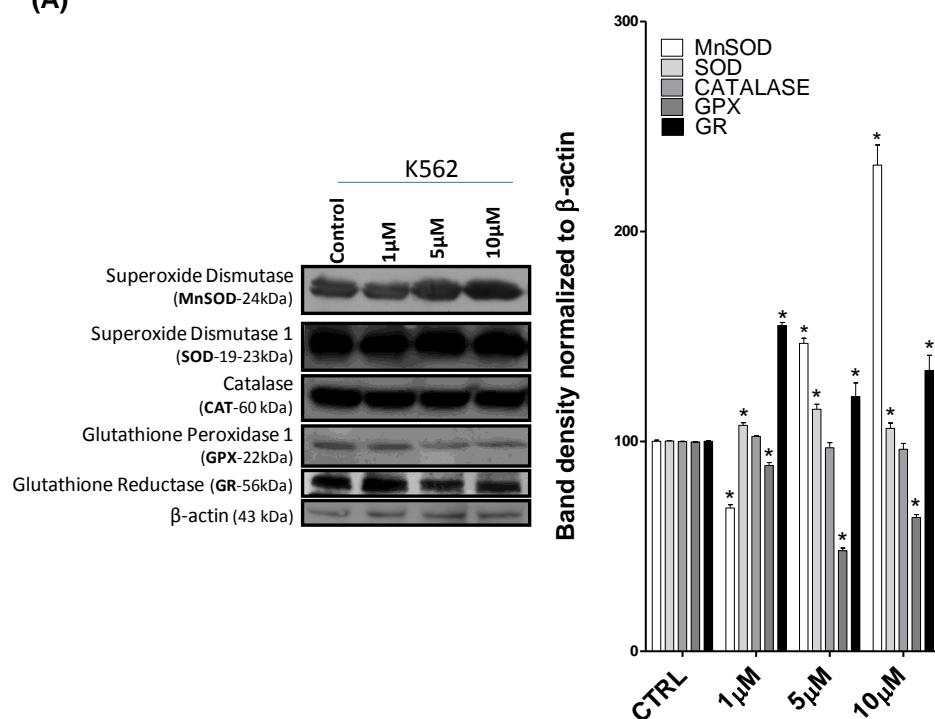


**Figure 8:** Protein c-Myc expression is modulated by calix[6]arene. Expression of c-Myc and densitometric analysis of the band was compared with their respective internal control.

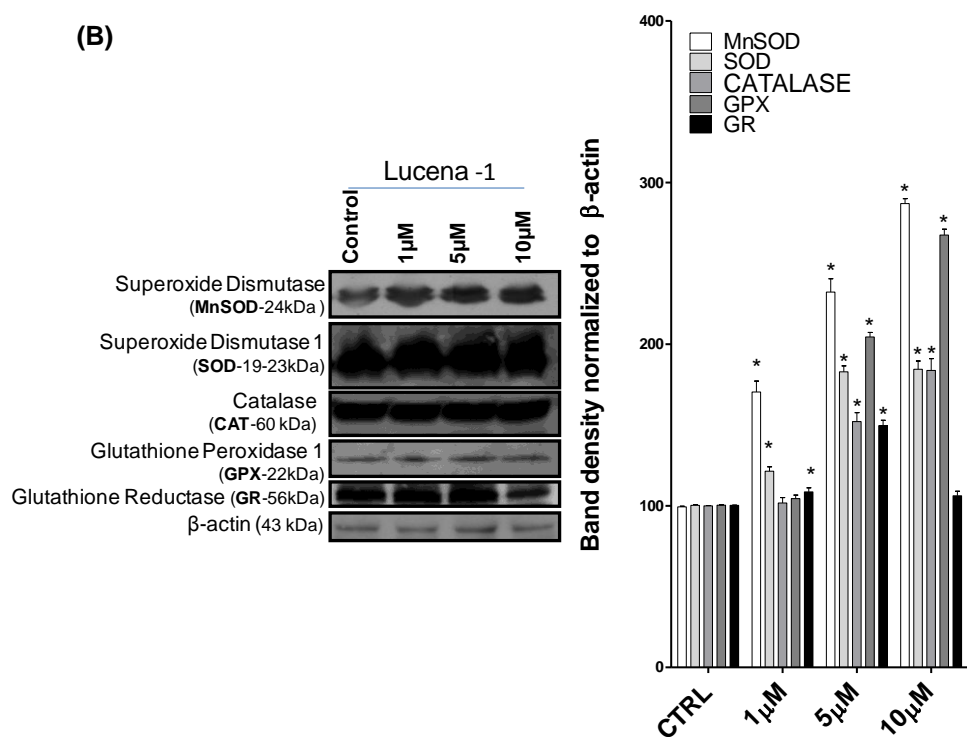
### Leukemia cells treated with calix[6]arene present difference in the expression of antioxidant enzymes

Next, we examined the expression of antioxidant enzymes: superoxide dismutase (MnSOD), superoxide dismutase 1 (copper zinc, CuZn-SOD), catalase, glutathione peroxidase (GPX) and glutathione reductase (GR). In K562 cells MnSOD was the main affected enzyme by calix[6]arene. We observed a slight effect in the GR expression and the other enzymes remained unchanged (Figure 9A). Interestingly, in Lucena-1 cells treated with 5 and 10  $\mu$ M calix[6]arene MnSOS, SOD, catalase and GPX were more expressed (Figure 9B).

(A)



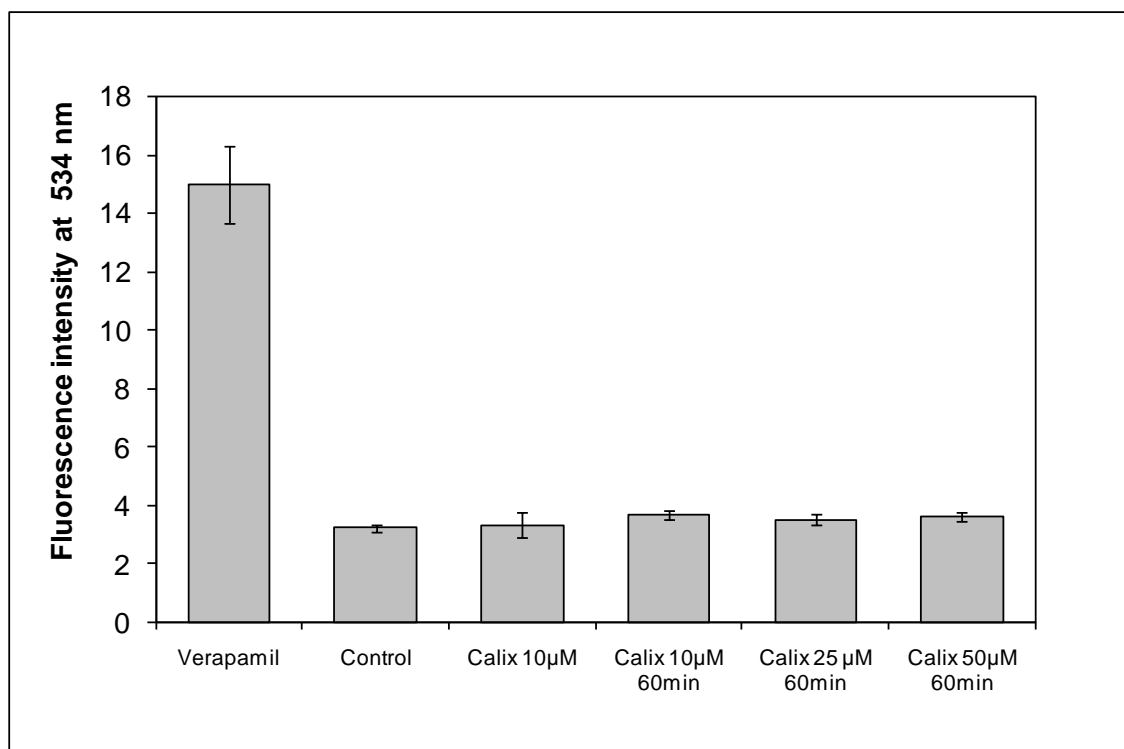
(B)



**Figure 9:** Effect of calix[6]arene on antioxidant enzymes expression. The expression of antioxidant enzymes was evaluated by immunoblotting. Soluble lysates were matched for protein content and analyzed on western blotting and densitometric analysis of the band were compared with their respective internal control.

## Leukemia cells treated with calix[6]arene present normal function of P-Glycoprotein

Functional analysis of P-Gp pump function revealed an efflux of the specific P-Gp substrate Rhodamine 123 from Lucena-1 cells after treatment with calix[6]arene. As expected, treatment of Lucena-1 cells with the P-Gp pump inhibitor, verapamil, resulted in a reduced Rhodamine efflux (Figure 10).



**Figure 10:** Effect of calix[6]arene on Lucena-1 cells P-Glycoprotein function. To measure P-Gp activity the substrate Rhodamine 123 was used. The following experimental conditions were employed: treatment of Lucena-1 cells with 10 µM calix[6]arene for 24 h, and with different concentration of this compound for 1 h. After the specified treatment period, cells were further incubated for 1h in the presence of 200 ng/mL Rhodamine 123 with or without P-Gp inhibitor (5 µM verapamil). Afterwards cells were washed with PBS and Rhodamine fluorescence was assessed by flow cytometric analysis of cell within the live-gate, using a FACScalibur (Becton and Dickinson, USA). The data were analyzed by WinList.

## Discussion

Improving chemotherapy for neoplastic disease constitutes one of the most important challenges in biomedical research. Among the major problems in dealing with leukemic disease is the build-up of resistance against therapy (Kondo *et al.*, 2005; Szakacs *et al.*, 2006). This may include resistance associated with decreased drug accumulation in the cell, altered intracellular drug distribution, increased detoxification, diminished drug-target interaction, increased DNA repair, altered cell-cycle regulation, and uncoupling of the pathways linking cellular damage with programmed cell death. Suppression of tumorigenesis often involves modulation of signal transduction pathways, leading to alterations in gene expression, cell cycle progression or apoptosis. Apoptosis is considered as an ideal way for destroying damaged cells and also a potential target for chemopreventive elimination of cancer cells (Singh *et al.*, 2002) and, as a consequence, targeting signaling elements controlling apoptosis may open novel therapeutic avenues (Hu e Kavanagh, 2003; Fulda e Debatin, 2006).

Importantly, calix[6]arene did not display toxic effect on normal human lymphocytes. On the other hand, we observed an expressive inhibition of leukemia cells growth, even on the resistant ones, by this compound. Calix[6]arene-induced apoptosis were also accompanied by an increase of the Bax/Bcl-2 ratio, PARP cleavage, pro-caspase 3 expression and negative modulation of Akt. Accordingly, calix[6]arene caused downregulation of c-Myc. c-Myc has long been known to be among the most frequently de-regulated oncogenes in human cancer. However, recently, a clear understanding of how it promotes transformation has been coming up: c-Myc alters the expression of hundreds of target genes, many of which are themselves oncogenes or tumor suppressors (Prochownik, 2008). In addition, K562 cells displayed an increase in AIF expression. AIF was identified as a mitochondrial intermembrane space protein, which is released from mitochondria and translocated to the nucleus, in response to apoptotic stimuli, and participates in peripheral chromatin condensation and the exposure of phosphatidylserine in



the outer leaf of the plasma membrane. Increasing evidence supports the notion that AIF plays an important role in caspase-independent apoptosis (Pepper *et al.*, 1997; Cande *et al.*, 2002).

Calix[6]arene affected cell cycle progression in K562 and Lucena-1 cells. Many anticancer drugs exhibit their activity by inhibiting cell cycle progression, for example, vinblastine and taxol block cell cycle at G2/M and cisplatin blocks cell cycle at G1/M phase, while methotrexate inhibits S phase (Cragg *et al.*, 1997; Jordan *et al.*, 1991; Shi *et al.*, 1998) and pseudolaric acid B (PAB) induced cell cycle arrest at G2/M phase in HL-60 cell (Ma *et al.* 2010). Calix[6]arene induced cell cycle arrest at G1 phase in both cells.

Calix[6]arene, even at low concentration 1  $\mu$ M, caused activation of phosphate and tensin homologue. PTEN is a phosphatase which dephosphorylates phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate [PtdIns(3,4,5)P3], a positive regulator of Akt. Thus, PTEN is a fundamental negative regulator of Akt activity (Chang *et al.*, 2004). Studies indicated that the candidate tumor suppressor, PTEN, could block the phosphatidylinositol 3'-kinase (PI3K)/Akt signaling pathway, resulting in cell death, inhibition of growth or both. Accordingly, Akt was inhibited in cells treated with calix[6]arene and c-Myc was downregulated. Calix[6]arene reduces level of phosphorylated Akt suggesting that calix[6]arene blocks Akt signaling. This action of calix[6]arene is particularly interesting since it could explain most of the various effects observed of calix[6]arene. The apoptotic response to conventional chemotherapy may be augmented by the inhibition of the Akt pathway. Akt directly phosphorylates several components of the cell death machinery and in this way protects cells from death and inhibits apoptosis (Vivanco e Sawyers, 2002). For instance, phosphorylation of Bad by Akt impedes its pro-apoptotic function (Del Peso *et al.*, 1997).

Antioxidant enzymes were more expressed on cells treated with calix[6]arene, which indicate that cells exposure to calix[6]arene display reducing environment. Cancer cells typically display chronic activation of signaling mechanisms that lead to deregulation of growth. Reactive oxygen species (ROS) may contribute to these mechanisms. For example, transformation of

hematopoietic cells by the oncogenic tyrosine kinase BCR-ABL1 is associated with a chronic increase of intracellular ROS (Rodrigues *et al.*, 2008). K562 and Lucena-1 cells express BCR-ABL1, therefore the increase of antioxidant enzymes expression induced by calix[6]arene might cause a negative modulation of this tyrosine kinase and consequently, a decrease on the proliferation rate and survival of both leukemia cell lines.

## Acknowledgements

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). P.A.F. is supported by doctoral studentship C.V.F. is supported by research fellowship from CNPq. We are grateful to Prof. Vivian Rumjanek (Federal University of Rio de Janeiro) for donating Lucena-1 cells.

## References

- Blaskovic M.A., Lin Q., Delarue F.L., Sun J, Park H.S., Coppola D., Hamilton A.D., Sebt S.M. Design of GFB-11, a platelet derived growth factor binding molecule with antiangiogenic and anticancer activity against human tumors in mice. Nat Biotechnol, v.18, p.1065-70. 2000.
- Candé C., Cohen I., Daugas E., Ravagnan L., Larochette N., Zamzami N., Kroemer G. Apoptosis-inducing factor (AIF): a novel caspase-independent death effector released from mitochondria. Biochimie, v.84, n.2-3, p.215-22. 2002.
- Chang C.J., Freeman D.J., Wu H. PTEN regulates Mdm2 expression through the P1 promoter. J Biol Chem, v.279, n.28, p.29841-8. 2004.
- Colston M.J., Hailes H.C., Stavropoulos E., Hervé A.C., Hervé G., Goodworth K.J., Hill A.M., Jenner P., Hart P.D., Tascon R. Antimycobacterial calixarenes enhance innate defense mechanisms in murine macrophages and induce control of

Mycobacterium tuberculosis infection in mice. Infect Immun, v.72, n.11, p.6318-23. 2004.

Cragg G.M., Newman D. J., Snader K. M. Natural products in drug discovery and development. J Nat Prod, v.60, n.1, p.52-60. 1997.

de Fatima A., Fernandes S.A., Sabino A.A. Calixarenes as new platforms for drug design. Curr Drug Discov Technol, v.6, n.2, p.151-70. 2009.

Dean M., Fojo T., Bates S. Tumour stem cells and drug resistance. Nat Rev Cancer, v.5, n.4, p.275-84. 2005.

Del Peso L., Gonzalez-Garcia M., Page C., Herrera R., Nunez G. Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. Science, v.278, n.5338, p.687-9. 1997.

Dings R.P., Chen X., Hellebrekers D.M., Van Eijk L.I., Zhang Y., Hoyer T.R., Griffioen A.W., Mayo K.H. Design of nonpeptidic topomimetics of antiangiogenic proteins with antitumor activities. J Natl Cancer Inst, v.98, n.13, p.932-6. 2006.

Fulda S., Debatin K. M. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. Oncogene, v.25, n.34, p.4798-811. 2006.

Hartree E.F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. Anal Biochem, v.48, n.2, p.422-7. 1972.

Higgins C.F. Multiple molecular mechanisms for multidrug resistance transporters. Nature, v.446, n.7137, p.749-57. 2007.

Hu W., Kavanagh J.J. Anticancer therapy targeting the apoptotic pathway. Lancet Oncol, v.4, n.12, p.721-9. 2003.

Jordan M. A., Thrower D., Wilson L. Mechanism of inhibition of cell proliferation by Vinca alkaloids. Cancer Res, v.51, n.8, p.2212-22. 1991.

Kondo Y., Kanzawa T., Sawaya R., Kondo S. The role of autophagy in cancer development and response to therapy. Nat Rev Cancer, v.5, n.9, p.726-34. 2005.

Ma G., Chong L., Li X.C., Khan I.A., Walker L. A., Khan S.I. Selective inhibition of human leukemia cell growth and induction of cell cycle arrest and apoptosis by pseudolaric acid B. J Cancer Res Clin Oncol. 2010.

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. J Immunol Meth, v.65, p.55-63.1983.

Motornaya A.A.L., Shokova E., Kovalev V.V Synthesis and antiherpetic activity of N-(3-amino-1-adamantyl) calix[4]arenes. Pharm Chem J, v.40, p.68. 2006.

Paquet V., Zumbuehl A., Carreira E.M. Biologically active amphotericin B-calix[4]arene conjugates. Bioconjug Chem, v.17, n.6, p.1460-3. 2006.

Pepper C., Hoy T., Bentley D.P. Bcl-2/Bax ratios in chronic lymphocytic leukaemia and their correlation with in vitro apoptosis and clinical resistance. Br J Cancer, v.76, n.7, p.935-8. 1997.

Piccoli C., D'aprile A., Scrima R., Ripoli M., Boffoli D., Tabilio A., Capitanio N. Role of reactive oxygen species as signal molecules in the pre-commitment phase of adult stem cells. Ital J Biochem, v.56, n.4, p.295-301. 2007.

Prochownik E.V. c-Myc: linking transformation and genomic instability. Curr Mol Med, v.8, n.6, p.446-58. 2008.

Renzi N.L. Jr, Stellar S.M., Ng K.T. Gas chromatographic assay of codeine in human plasma utilizing nitrogen-selective detection. J Chromatogr, v.278, n.1, p.179-84. 1983.

Rodrigues M.S., Reddy M.M., Sattler M. Cell cycle regulation by oncogenic tyrosine kinases in myeloid neoplasias: from molecular redox mechanisms to health implications. Antioxid Redox Signal, v.10, n.10, p.1813-48. 2008.

Rumjanek V.M., Trindade G.S., Wagner-Souza K., de-Oliveira M.C., Marques-Santos L.F., Maia R.C., Capella M.A. Multidrug resistance in tumour cells: characterization of the multidrug resistant cell line K562-Lucena 1. An Acad Bras Cienc, v.73, n.1, p.57-69. 2001.

Sebti S.M., Hamilton A. D. Design of growth factor antagonists with antiangiogenic and antitumor properties. Oncogene, v.19, n.56, p.6566-73. 2000.

Shi Q., Chen K., Morris-Natschke S.L., Lee K.H. Recent progress in the development of tubulin inhibitors as antimitotic antitumor agents. Curr Pharm Des, v.4, n.3, p.219-48. 1998.

Singh R.P., Dhanalakshmi S., Agarwal R. Phytochemicals as cell cycle modulators--a less toxic approach in halting human cancers. Cell Cycle, v.1, n.3, p.156-61. 2002.

Skorski T., Kanakaraj P., Nieborowska-Skorska M., Ratajczak M.Z., Wen S.C., Zon G., Gewirtz A.M., Perussia B., Calabretta B. Phosphatidylinositol-3 kinase activity is regulated by BCR/ABL and is required for the growth of Philadelphia chromosome-positive cells. Blood, v.86, n.2, p.726-36. 1995.

Szakacs G., Paterson J.K., Ludwig J.A., Booth-Genthe C., Gottesman M.M. Targeting multidrug resistance in cancer. Nat Rev Drug Discov, v.5, n.3, p.219-34. 2006.

Vivanco I., Sawyers C.L. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. Nat Rev Cancer, v.2, n.7, p.489-501. 2002.

Zhou H., Wang D.A., Baldini L., Ennis E., Jain R., Carie A., Sebti S.M., Hamilton A.D. Structure-activity studies on a library of potent calix[4]arene-based PDGF antagonists that inhibit PDGF-stimulated PDGFR tyrosine phosphorylation. Org Biomol Chem, v.4, n.12, p.2376-86. 2006.

## **CAPÍTULO 2**

## **CAPÍTULO 2**

### **Contribution of the Low Molecular Weight Protein Tyrosine Phosphatase for Human Erythroblastic Leukemia Resistance Maintenance**

**Authors:** Paula Anastácia Ferreira<sup>a</sup>, Karla Cristiana Souza Queiroz<sup>b</sup>, Roberta R. Ruela-Sousa<sup>b</sup>, Ana Carolina Santos de Souza Galvão<sup>a</sup>, Maikel P. Peppelenbosch<sup>b</sup>, Carmen Veríssima Ferreira<sup>a\*</sup>

#### **Institutions:**

<sup>a</sup>Laboratory of Biossays and Signal Transduction, Biochemistry Department, Biology Institute, University of Campinas (UNICAMP), C.P. 6109, CEP 13083-970, Campinas, SP, Brazil.

<sup>b</sup>Department of Cell Biology, University Medical Center Groningen, University of Groningen, Groningen, The Netherlands.

**\*Corresponding author:** Carmen V. Ferreira (PhD), Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), C.P. 6109, CEP 13083-970, Campinas, SP, Brazil. Tel: +55-19-3521-6659; Fax: 55-19-3521-6129; E-mail address: [carmenv@unicamp.br](mailto:carmenv@unicamp.br).

## **Abstract**

Beyond the side effects of antitumor agents, the multidrug resistance (MDR) limits the efficacy of continuous chemotherapeutic treatment. In this work, we evaluated the importance of the low molecular weight protein tyrosine phosphatase (LMWPTP) for maintenance of resistance of human leukemia cells. Lucena cells, which present high expression of P-Glycoprotein also contain high level of LMWPTP. Interestingly, when this phosphatase was silenced, the leukemia cells response appeared to be more efficient towards chemotherapies. On the other hand, overexpression of this enzyme in K562 (non resistant cells) provoked insensitivity to vincristine. Our findings suggest that LMWPTP contributes with the resistance phenotype via supporting the activation status of Src and BCR-ABL kinases. This work brought out the first evidence of the LMWPTP role in cancer resistance.

**Keywords:** Low Molecular Weight Protein Tyrosine Phosphatase, leukemia, Resistance



## Introduction

Failure of cancer chemotherapy can occur through increased efflux of chemotherapeutic agents, leading to the reduction of intracellular drug levels and consequent drug insensitivity, often to multiple agents. A well-established cause of multidrug resistance (MDR) involves the increased expression of members of the ATP binding cassette (ABC) transporter superfamily, many of which efflux various chemotherapeutic compounds from cells. In this context, resistance to chemotherapy is a major drawback in the effective treatment of leukemia. Although initially most of these leukemias react favourably to chemotherapy, the chemotherapeutic treatment outcome of most adult acute myeloid leukemia remains unacceptable. The major problem here is the build-up of resistance against therapy (Dean *et al.*, 2005; Higgins, 2007). Under this aspect, the identification of new mediators which contribute with the cancer cells resistance process acquisition can open a new avenue to improve the chemotherapy. Herein, we report that LMWPTP contributes to cancer resistance maintenance. Leukemia cells which overexpress P-Gp present high amount of LMWPTP, besides when the non resistant leukemia cells (K562) was transfected with the plasmid for this phosphatase, the sensitivity of these cells towards vincristine dropped. Importantly, the silencing of LMWPTP in Lucena-1 cells rescue the ability of vincristine to kill these cells.

## **Materials and methods**

### **Cell line and Reagents**

K562 cells were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD) and the resistant cell line Lucena-1 was produced as described previously (Rumjanek *et al.*, 2001). Anti-sheep, anti-rabbit, anti-goat and anti-mouse peroxidase-conjugated antibodies were purchased from Cell Signaling Technology (Beverly, MA). Antibodies against GAPDH and  $\beta$ -actin were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). LMWPTP antibody was from Abcam, Src, p-Src, FAK, p-FAK were from Cell Signaling.

### **Cell Culture**

K562 and Lucena-1 cells were routinely grown in suspension in RPMI 1640 medium supplemented with 2 mM glutamine, 100 IU/ml penicillin, 100  $\mu$ g/ml streptomycin and 10 % heat-inactivated fetal bovine serum, at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> humidified atmosphere. In the Lucena-1 culture medium vincristine 60 nM was routinely added (Rumjanek *et al.*, 2001).

### **K562 and Lucena 1 treatment**

Cells were plated at  $1 \times 10^5$  cells/mL and treated with vincristine or Gleevec for 24h. After treatment the cell viability was assessed by trypan blue dye exclusion (Renzi *et al.*, 1983).

### **Western blotting analysis**

Cells ( $3 \times 10^7$ ) were lysed in 200  $\mu$ L of lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4), 1% Tween 20, 0.25% sodium deoxycholate, 150 mM NaCl, 1 mM EGTA, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 mM NaF and protease inhibitors (1  $\mu$ g/ml aprotinin, 10  $\mu$ g/ml leupeptin, and 1 mM 4-(2-aminoethyl) benzenesulfonyl-fluorid-hydrochloride)] for 2h on ice.

Protein extracts were cleared by centrifugation and protein concentrations were determined using the Lowry method (Hartree, 1972). Twice the volume of SDS gel loading buffer (100 mM Tris-HCl pH 6.8), 200 mM DTT, 4% SDS, 0.1% bromophenol blue and 20% glycerol) was added to samples which were subsequently boiled for 5 min. Cell extracts were resolved by SDS-polyacrylamide gel (12%) electrophoresis (PAGE) and transferred to nitrocellulose membranes. Membranes were blocked in 5% fat-free dried milk or bovine serum albumin in Tris-buffered saline-Tween 20 (0.1%) and incubated overnight at 4°C with the appropriate primary antibody at 1:1000 dilution. After washing in TBS-Tween 20 (0.1%), membranes were incubated with anti-rabbit, anti-mouse and anti-goat horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies, at 1:5000 dilutions, in blocking buffer for 1h. Proteins were detected using enhanced chemiluminescence.

### **P-Glicoprotein activity evaluation**

To measure P-Gp activity the substrate Rhodamine 123 was used. For this LMWPTP was silencing and after 24h cells were further incubated for 30 min in the presence of 200 ng/mL Rhodamine 123 with or without P-Gp inhibitor (5µM verapamil). Afterwards cells were washed with PBS and left at 37°C for a further 1h with or without the inhibitor, washed and again suspended in cold PBS and kept on ice. Rhodamine fluorescence was subsequently assessed by flow cytometric analysis of cell within the live-gate, using a FACScalibur (Becton and Dickinson, USA). The data were analyzed by WinList.

### **Transfection of K562 cells with LMWPTP**

K562 cells (100.000/mL) were grown for 24h and the transfections were done using an Effectene transfection kit (QIAGEN Benelux, Venlo, Netherlands) according to the manufacturer's instructions. Briefly, the cells were transfected with 2.4 µg of pcDNA3.1/V5-His-TOPO vector with or without an insert containing the sequence of human LMWPTP after a cytomegalovirus promoter. Overexpression was always verified by western blotting.

### **Transfection of K562 and Lucena-1 cells with siLMWPTP**

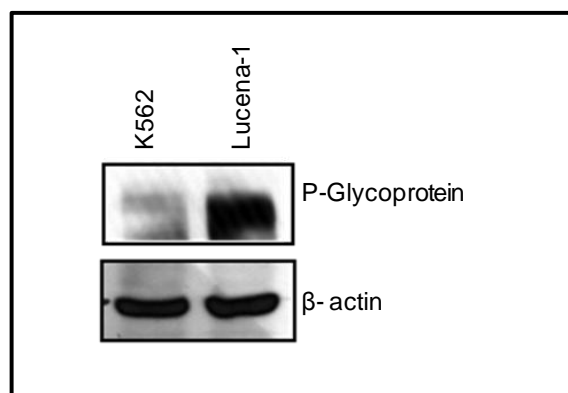
Lucena-1 cells (100.000/mL) were grown for 24h and subsequently transiently transfected with siLMWPTP. Transfections were done using a Hiperfect transfection kit (QIAGEN Benelux, Venlo, Netherlands) according to the manufacturer's instructions. Briefly, the cells were transfected with LMWPTP siRNA (final concentration: 5 nM) or MAPK1 siRNA (positive control) for 72h, and then washed with PBS and lysed with a specific buffer for western blotting procedure. Lysates were subsequently mixed with loading buffer for electrophoresis. The efficiency of transfection was assessed based on the expression of LMWPTP by western blotting analysis.

### **Statistical analysis**

All experiments were performed in triplicate and results were shown in the graphs as the means  $\pm$  S.D.M. Soluble lysates were matched for protein content and analysed by Western blotting. Analysis of immunoblotting band density was performed with the Scion Image® software (Frederick, MD, USA). All bands were compared with their respective internal control. Differences were analyzed using a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferoni post test compared the group control relationship treaty group. (\*) p values < 0.05 were considered significant . All data were analyzed using GraphPad Prism Software, Version 5.0.

## Results

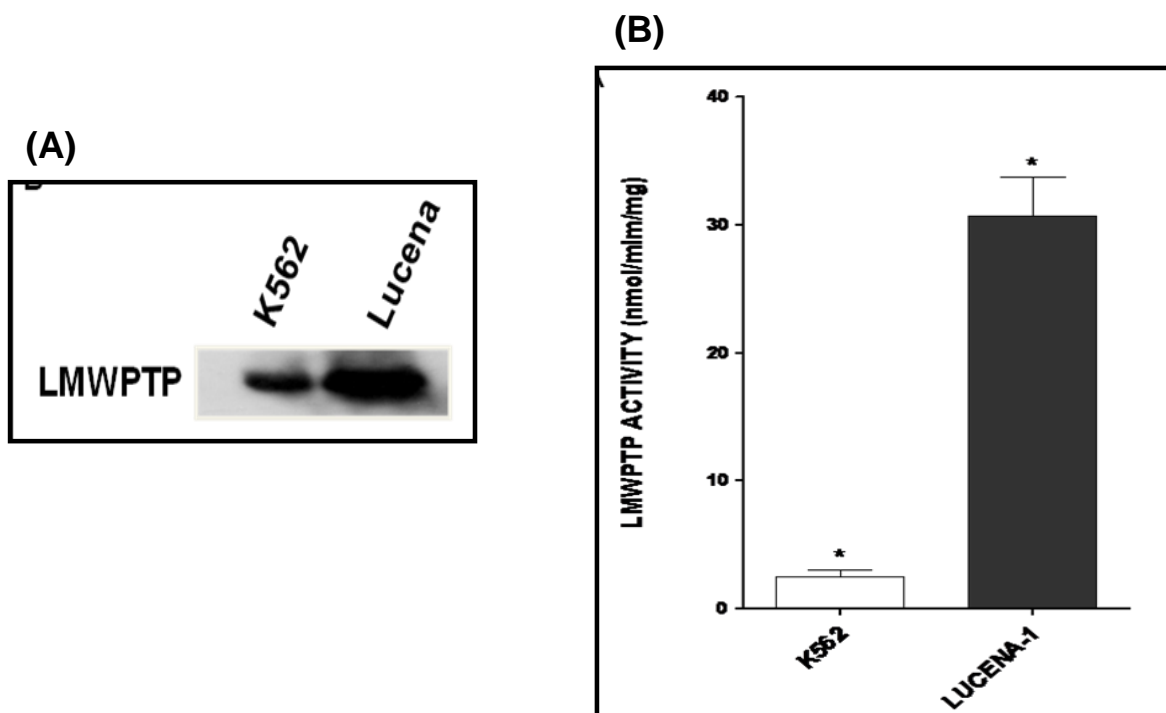
Figure 1 shows that indeed Lucena-1 cells display high expression of P-Glycoprotein and therefore, this cell line is a good model to identify intracellular mediators that might contribute for maintaining the resistant phenotype.



**Figure 1:** Expression of P-Glycoprotein on both leukemia cell lines. Cells (100.000/mL) were plating and after 24h lysed and the expression of P-Glycoprotein was evaluated by immunoblotting. Soluble lysates were matched for protein content and analyzed by Western blot and  $\beta$ -actin was used as internal control.

### **Leukemia cells containing resistant phenotype present high level of LMWPTP**

K562 cell presents lower LMWPTP expression than its counterpart that overexpresses P-Gp (Figure 2A). Next, we immunoprecipitated the LMWPTP and afterwards measured its activity. Accordingly, Lucena-1 cells contain about 7-fold more LMWPTP activity (Figure 2B).



**Figure 2:** Low Molecular Weight Protein Tyrosine Phosphatase expression and activity on leukemia cells. **(A)** LMWPTP expression was examined in the total lysate of both leukemia cells. **(B)** Low molecular weight protein tyrosine phosphatase from K562 and Lucena-1 cells was immunoprecipitated and afterwards its activity determined by using p-nitrophenyl phosphate as substrate.

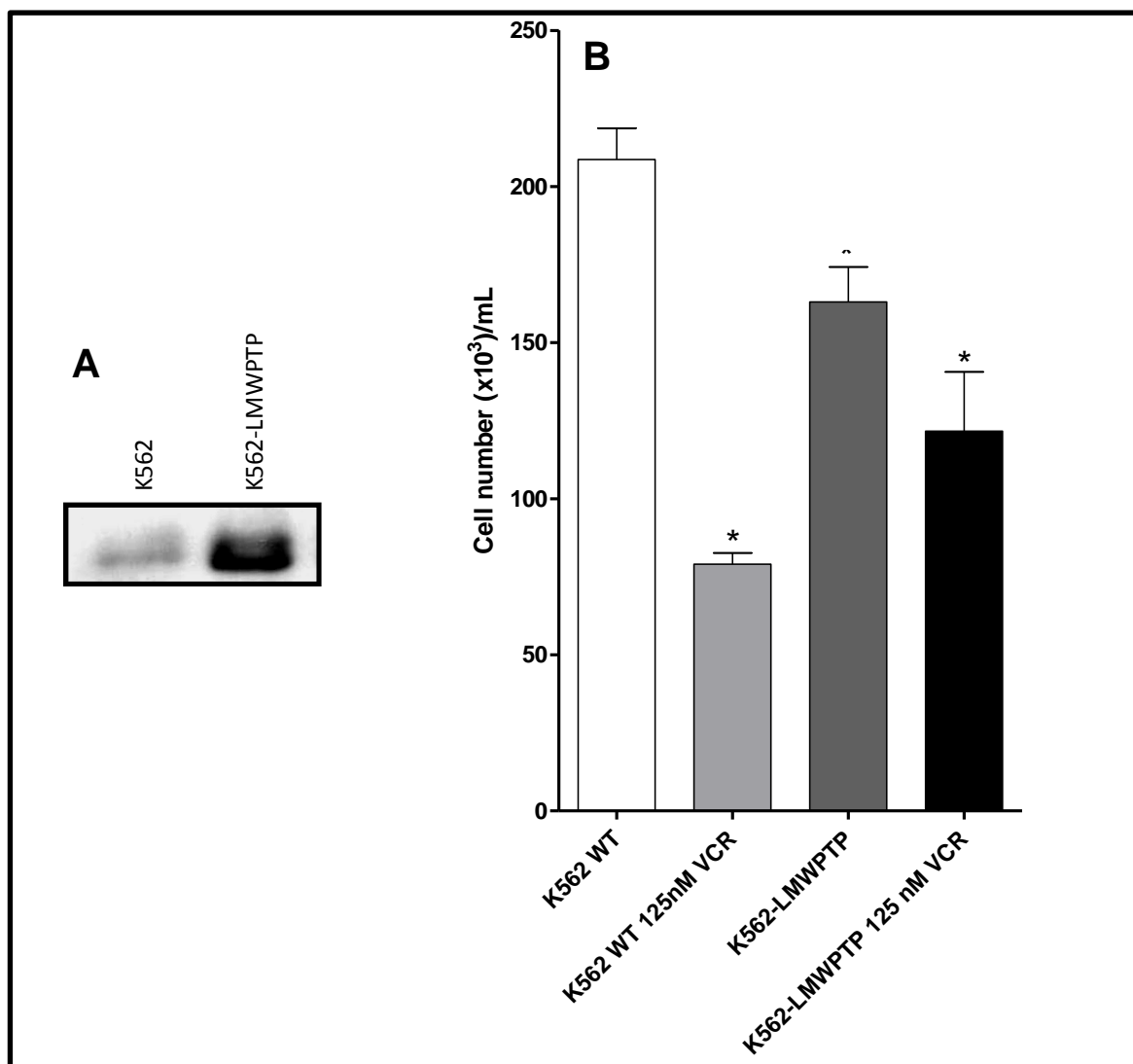
### **An increase of LMWPTP expression on K562 led to less sensitivity towards vincristine**

In order to provide more information about the possible involvement of the LMWPTP on the resistant phenotype maintenance, we transfected K562 cells with the LMWPTP and subsequently, treated these cells with vincristine. Interestingly, K562 cells with higher expression of LMWPTP became more resistant to vincristine (Figure 3).

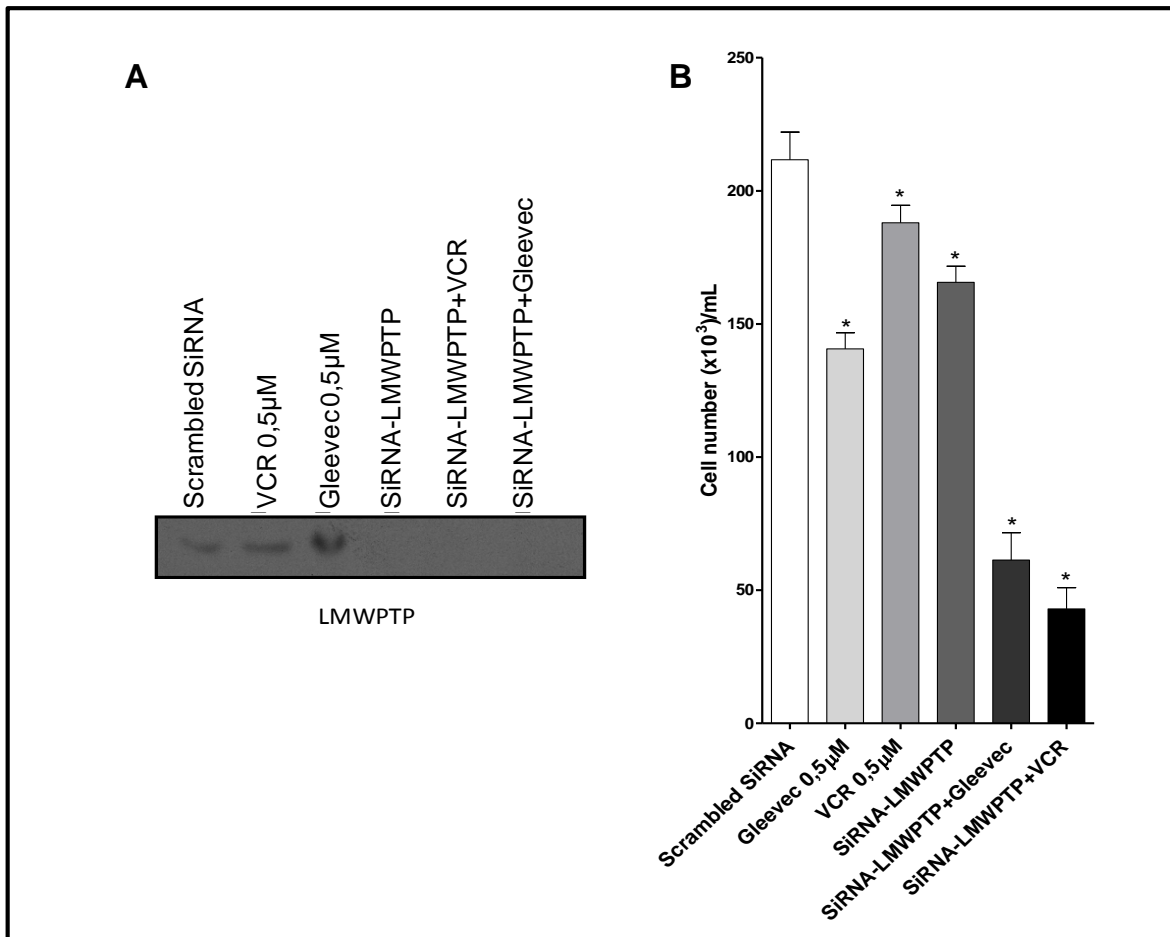
### **LMWPTP silencing causes an increase of Lucena cells sensitivity towards vincristine and Gleevec**

Lucena cells were treated with vincristine or Gleevec 24h after LMWPTP silencing. Figure 4A shows that these cells became more sensitive to both drugs

after LMWPTP silencing. Importantly, silenced cells demonstrated to present lower level of phospho-Src at activator site (Figure 4B). Interestingly, in these cells BCR-ABL was less phosphorylated (Figure 5). These results prompted us to examine if there is a correlation between the LMWPTP and P-Glycoprotein activity. Despite being more sensitive towards chemotherapeutics, leukemia cells in which LMWPTP was silenced did not present any alteration in the P-Gp function (Figure 6).

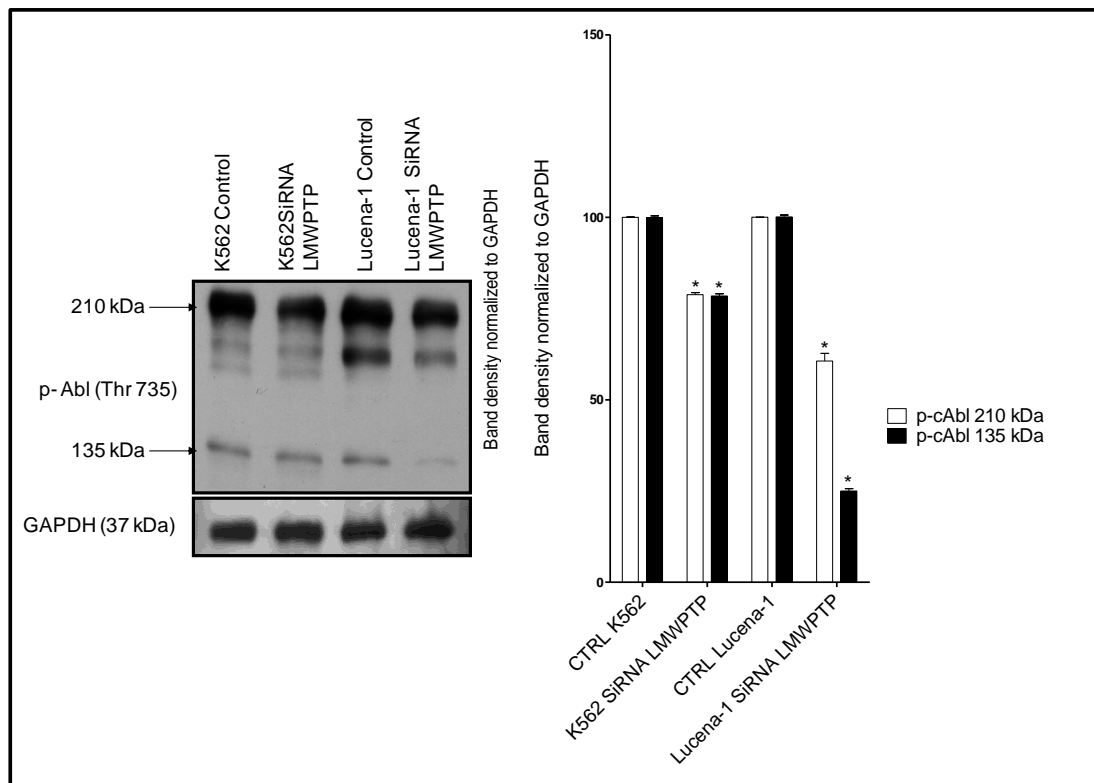
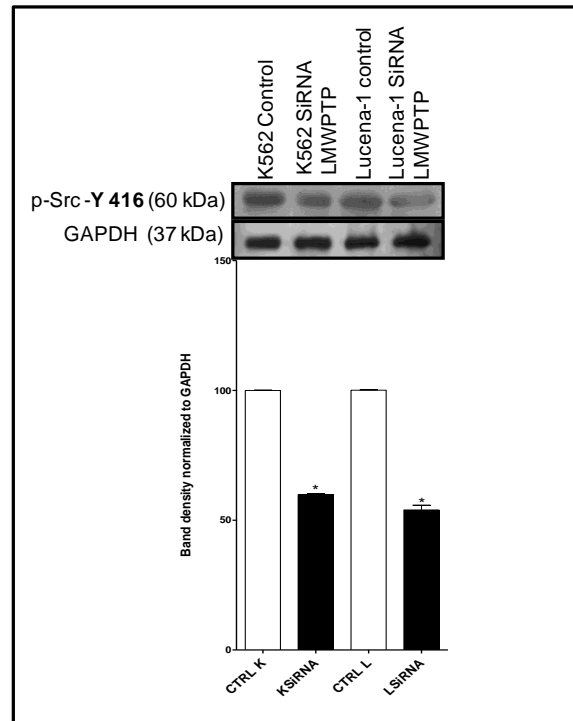


**Figure 3:** K562 cells overexpressing the LMWPTP are less sensitive towards vincristine. **(A)** Low molecular weight protein tyrosine phosphatase was overexpressed in K562 and LMWPTP expression was examined in the total lysate of leukemia cells. **(B)** K562 cells were treated with vincristine for 24h, subsequently the viable cells were counted.

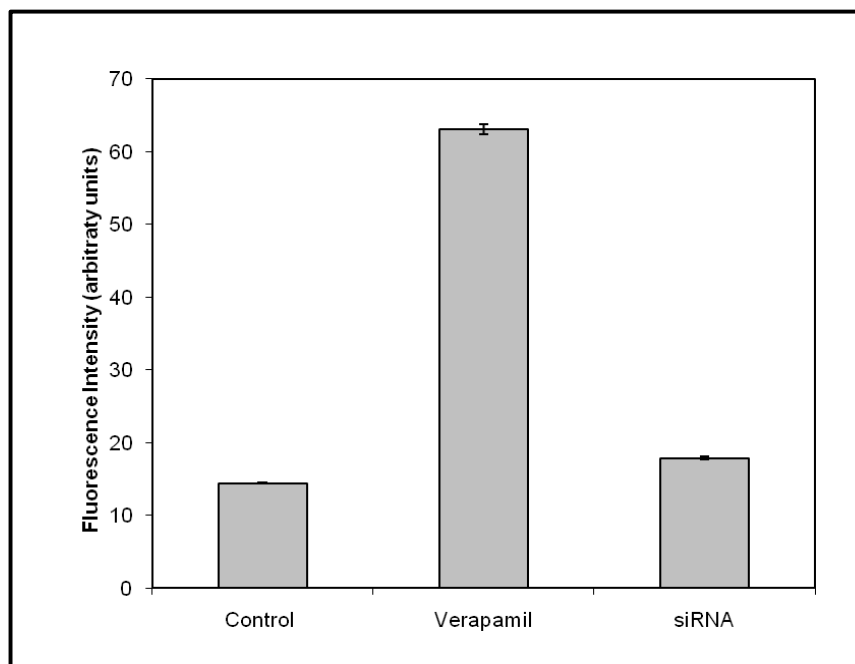


**Figure 4:** LMWPTP silencing causes an improvement of cytotoxicity effect of chemotherapeutics. **(A)** Low molecular weight protein tyrosine phosphatase was silencing in Lucena-1 and LMWPTP expression was examined in the total lysate of leukemia cells. **(B)** Lucena-1 cells were treated with vincristine (500nM) or Gleevec (500nM) for 24h, subsequently, the viable cells were counted.





**Figure 5:** Phosphorylation status of Src kinase and BCR-ABL in LMWPTP silencing leukemia cells.

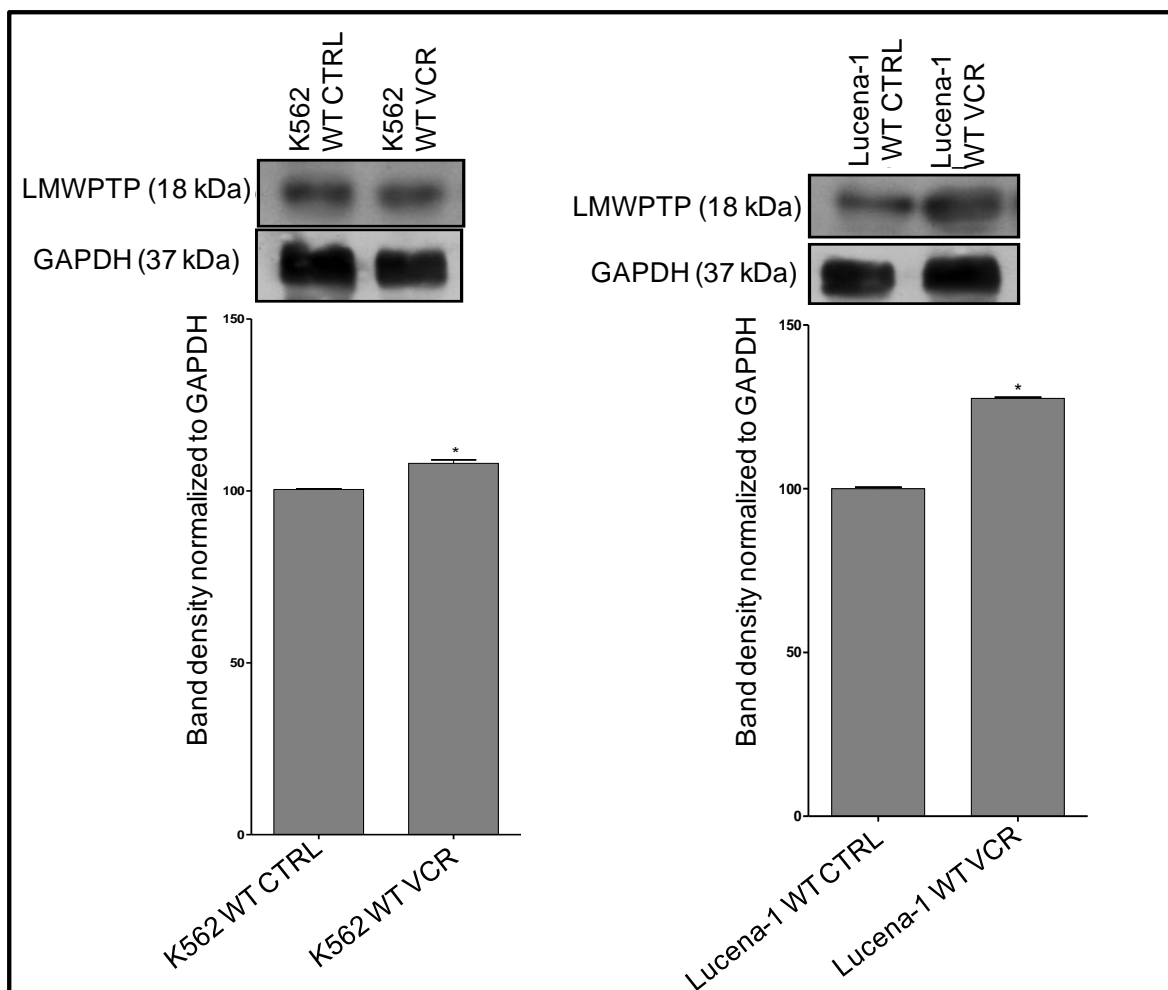


**Figure 6:** Analysis of P-Glycoprotein activity. To measure P-Gp activity the substrate Rhodamine 123 was used. For this LMWPTP was silenced and after 24h cells were further incubated for 1h in the presence of 200 ng/mL Rhodamine 123 with or without P-Gp inhibitor (5  $\mu$ M verapamil). Afterwards cells were washed with PBS and Rhodamine fluorescence was assessed by flow cytometric analysis of cell within the live-gate, using a FACScalibur (Becton and Dickinson, USA). The data were analyzed by WinList.

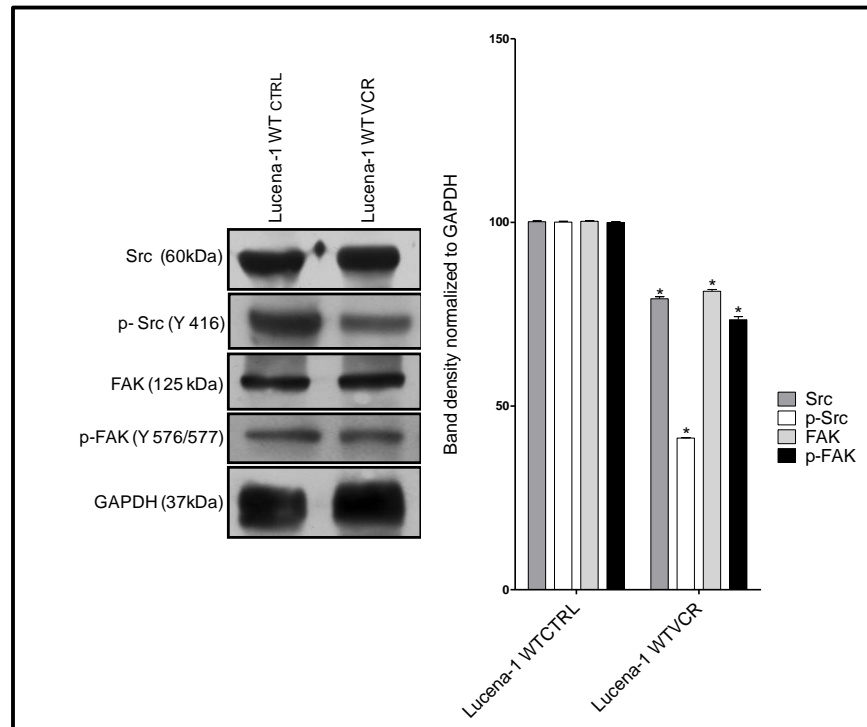
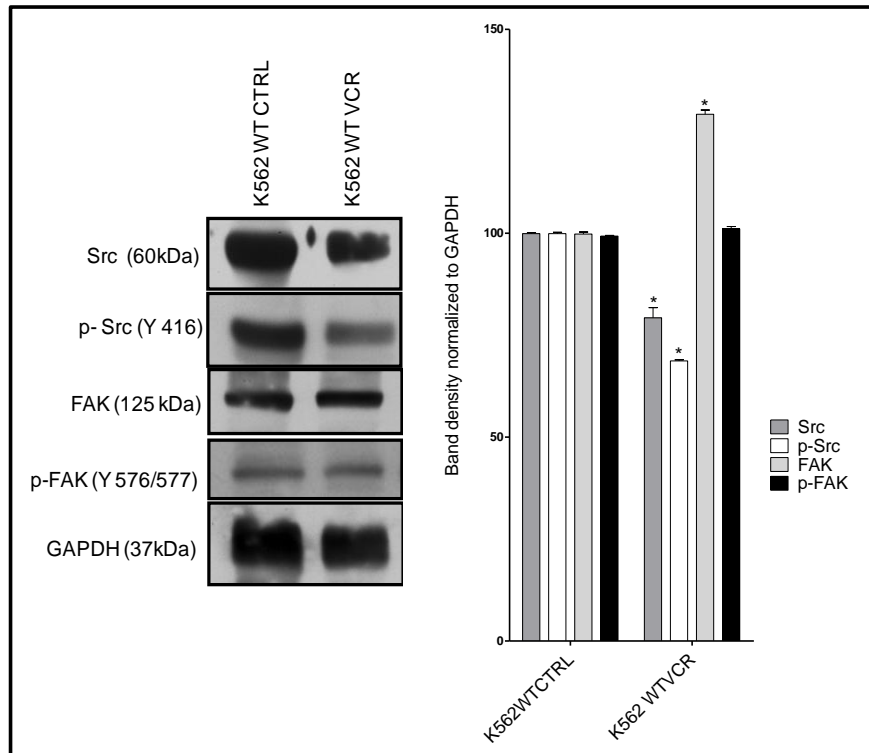
### **Death inductor stimulus cause changing on the LMWPTP expression**

Next, in order to get more evidence about the importance of the LMWPTP for the chemotherapeutic resistance process, we checked the expression of the LMWPTP on both leukemia cells treated with vincristine. Both cell lines displayed a tendency in increasing the expression of the LMWPTP (Figure 7).

Taking in consideration the role of kinases from Src family in the cellular proliferation, survival and transformation, as well as the capacity of these kinases in regulating the LMWPTP, we investigated the Src phosphorylation status of the stimulatory residue (Tyr416). Figure 8 shows that both leukemia cell lines had a decrease of the active form of Src after treatment with vincristine. Importantly, the phosphorylation (Tyr576 e Tyr577) level of FAK remained unchanged.



**Figure 7:** Expression of LMWPTP on leukemia cells treated with vincristine. Cells were treated with vincristine for 24h, afterwards the expression of LMWPTP was analyzed.



**Figure 8:** Expression and phosphorylation status of kinases. Phosphorylation and expression status of leukemia cells kinases after treatment with vincristine. (A): K562 and (B) Lucena-1.

## Discussion

Improving chemotherapy for neoplastic disease constitutes one of the most important challenges in biomedical research. Among the major problems in dealing with leukaemic disease is the build-up of resistance against therapy (Kondo *et al.*, 2005; Szakacs *et al.*, 2006). This may include resistance associated with decreased drug accumulation in the cell, altered intracellular drug distribution, increased detoxification, diminished drug-target interaction, increased DNA repair, altered cell-cycle regulation, and uncoupling of the pathways linking cellular damage with programmed cell death. Suppression of tumorigenesis often involves modulation of signal transduction pathways, leading to alterations in gene expression, cell cycle progression or apoptosis. Apoptosis is considered as an ideal way for destroying damaged cells and also a potential target for chemopreventive elimination of cancer cells (Singh *et al.*, 2002) and, as a consequence, the target of signaling elements controlling apoptosis may open novel therapeutic avenues (Hu e Kavanagh, 2003; Fulda e Debatin, 2006).

The ubiquitous nature of protein phosphorylation/dephosphorylation underscores its key role in signal transduction pathways associated to the control of critical processes responsible for the cell homeostasis such as metabolism, proliferation, survival, differentiation and death. Integrated networks of intracellular signalling pathways act via cascades of sequential phosphorylation or dephosphorylation reactions which are governed by the action of protein kinases (PKs) and protein phosphatases (PPs), respectively. Thus PKs and PPs have a pivotal role in regulating normal cell physiology and dysregulation of these enzymes is involved in the development of numerous inherited and acquired human diseases (Ferreira *et al.*, 2006). In this work we show for the first time that the LMWPTP activity has a correlation with leukemia cells resistance maintenance. LMWPTP has been recognized as a possible positive mediator in tumour onset and progression. In different tumor types the overexpression of this phosphatase is generally prognostic for a more aggressive cancer (Malentacchi *et al.*, 2005; Chiarugi *et al.*, 2004; Souza *et al.*, 2009).

In relation to kinases, we observed that K562 and Lucena-1 cells treated with vincristine had lesser levels of activated FAK and Src. Importantly, our findings indicate that LMWPTP contributes for Lucena-1 resistance probably via maintaining the activation of Src, and BCR-ABL.

Focal adhesion kinase (FAK) and Src are nonreceptors tyrosines kinases. Tyrosine kinases catalyse the transfer of phosphate in adenosine 5' triphosphate (ATP) to tyrosine residues in cellular substrates. FAK localizes to the focal adhesions and coordinates signals from integrins, cytokines, growth factor receptors and oncogenes, playing an important role in cell motility and survival of extracellular signal-regulated kinase (ERK), PI3K/Akt, MAPK and JAK/STAT signaling pathways (Chen *et al.*, 2008). Gotoh's group (Gotoh *et al.*, 1995) have shown that FAK is constitutively phosphorylated and activated, probably by BCR-ABL, in Philadelphia chromosome-positive leukemia cells lines, including K562 cells, while Recher and co-workers (2004), demonstrated that FAK is aberrantly expressed and activated in acute myeloid leukemia (AML) cells and that FAK<sup>+</sup> AML cells displayed significantly higher migration capacities and resistance to daunorubicin, compared with FAK<sup>-</sup> cells. Interestingly, the authors have also shown that downregulation of FAK in CD34<sup>+</sup> significantly decreased migration and daunorubicin resistance in these cells. Proteins of Src kinase family are expressed in hematopoietic cells and are involved in signaling pathways that regulate cell growth and proliferation. Src can be activated by cytoplasmic proteins such FAK, or its molecular partner Crk-associated substrate (CAS). Elevated Src activity may be caused by increased transcription or by deregulation due to overexpression of its upstream mediators such, FAK, PDGFR, FGFR, integrin and VEGFR (Finn RS, 2006). In multiple tumors, overexpression and activation of both c-Src and FAK have been demonstrated leading to increased invasive and metastatic potential (Alvarez *et al.*, 2006).

Chronic myeloid leukemia cells, such as K562 and Lucena-1, are characterized by the Philadelphia chromosome translocation that causes expression of BCR-ABL, a deregulated tyrosine kinase. Constitutively activated BCR-ABL promotes leukemia cells proliferation and survival. We demonstrated in

this work that when the LMWPTP was silenced, the level of BCR-ABL phosphorylation at the activator site decreased. This finding reinforces our hypothesis that this phosphatase might contribute for both leukemia cell survival and resistance.

## **Acknowledgements**

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). C.V.F. is supported by research fellowship from CNPq. We are grateful to Prof. Vivian Rumjanek (Federal University of Rio de Janeiro) for donating Lucena-1 cells.

## References

Alvarez R.H., Kantarjian H.M., Cortes J.E. The Role of Src in Solid and Hematologic Malignancies. American Cancer Society. p.1918-1929.2006.

Chen S.Y., Moroi Y., Urabe K., Takeuchi S., Kido M., Hayashida S., Uchi H., Uenotsuchi T., Tu Y.T., Furue M. Concordant overexpression of p-FAK and p-ERK 1/2 extramammary Paget's disease.

Chiarugi P., Taddei M.L., Schiavone N., Papucci L., Giannoni E., Fiaschi T., Capaccioli S., Raugei G., Ramponi G. LMW-PTP is a positive regulator of tumor onset and growth. Oncogene, v.23, n.22, p.3905-14. 2004.

Dean M., Fojo T., Bates S. Tumour stem cells and drug resistance. Nat Rev Cancer, v.5, n.4, p.275-84. 2005.

Ferreira C.V., Justo G.Z., Souza A.C., Queiroz K.C., Zambuzzi W.F., Aoyama H., Peppelenbosch M.P. Natural compounds as a source of protein tyrosine phosphatase inhibitors: application to the rational design of small-molecule derivatives. Biochimie, v.88, n.12, p.1859-73. 2006.

Finn R.S. Targeting Src in breast Cancer. Annals of oncology, v.19, p.1379-1386.2008.

Fulda S., Debatin K. M. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. Oncogene, v.25, n.34, p.4798-811. 2006.

Gotoh A., Miyazawa K., Ohyashiki K., Tauchi T., Boswell H.S., Broxmeyer H.E., Toyama K. Tyrosine phosphorylation and activation of focal adhesion kinase (p125FAK) by BCR-ABL oncoprotein, Exp. Hematol. v.23, p.1153-1159. 1995.

Higgins C.F. Multiple molecular mechanisms for multidrug resistance transporters. Nature, v.446, n.7137, p.749-57. 2007.

Hu W., Kavanagh J.J. Anticancer therapy targeting the apoptotic pathway. Lancet Oncol, v.4, n.12, p.721-9. 2003.

Kirshner K.M., Baltensperger K. Erythropoietin promotes resistance against the Abl tyrosine kinase inhibitor imatinib (STI571) in K562 human leukemia cells, Mol. Cancer Res. v.13,p. 970-980. 2003.

Kondo Y., Kanzawa T., Sawaya R., Kondo S. The role of autophagy in cancer development and response to therapy. Nat Rev Cancer, v.5, n.9, p.726-34. 2005.



Malentacchi F., Marzocchi R., Gelmini S., Orlando C., Serio M., Ramponi G. Raugei G. Up-regulated expression of low molecular weight protein tyrosine phosphatases in different human cancers. Biochem Biophys Res Commun, v.334, n.3, p.875-83. 2005.

Recher C., Ysebaert L., Beyne-Rauzy O., Mansat-De Mas V., Ruidavets J.B., Cariven P., Demur C., Payrastre B., Laurent G., Racaud-Sultan C. Expression of focal adhesion kinase in acute myeloid leukemia is associated with enhanced blast migration, increased cellularity, and poor prognosis, Cancer Res. v.64, p.3191-3197. 2004.

Renzi N. L. Jr, Stellar S.M., Ng K.T. Gas chromatographic assay of codeine in human plasma utilizing nitrogen-selective detection. J Chromatogr, v.278, n.1, p.179-84. 1983.

Rumjanek, V.M., Trindade G.S., Wagner-Souza K., de-Oliveira M.C., Marques-Santos L.F., Maia R.C., Capella M.A. Multidrug resistance in tumour cells: characterization of the multidrug resistant cell line K562-Lucena 1. An Acad Bras Cienc, v.73, n.1, p.57-69. 2001.

Singh R.P., Dhanalakshmi S., Agarwal R. Phytochemicals as cell cycle modulators--a less toxic approach in halting human cancers. Cell Cycle, v.1, n.3, p.156-61. 2002.

Souza A.C., Azoubel S. Queiroz K.C., Peppelenbosch M.P., Ferreira C.V. From immune response to cancer: a spot on the low molecular weight protein tyrosine phosphatase. Cell. Mol. Life Sci.v.66, n.7. p. 1140-53.2009.

Szakacs G., Paterson J.K., Ludwig J.A., Booth-Genthe C. Gottesman M.M.. Targeting multidrug resistance in cancer. Nat Rev Drug Discov, v.5, n.3, p.219-34. 2006.

## **CAPÍTULO 3**

## **CAPÍTULO 3**

### **Modulação do status redox: implicações na ação de antitumorais como indutores da diferenciação e apoptose de células leucêmicas**

Paula Anastácia Ferreira e Carmen Veríssima Ferreira \*

Laboratory of Biossays and Signal Transduction, Biochemistry Department, Biology Institute, University of Campinas (UNICAMP), C.P. 6109, CEP 13083-970, Campinas, SP, Brazil.

**\*Corresponding author:** Carmen V. Ferreira (PhD), Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), C.P. 6109, CEP 13083-970, Campinas, SP, Brazil. Tel: +55-19-3521-6659; Fax: 55-19-3521-6129; E-mail address: [carmenv@unicamp.br](mailto:carmenv@unicamp.br).

## 1. INTRODUÇÃO

A alteração do estado redox celular pode provocar aumento na mutagênese e apoptose (Matés e Sánchez-Jiménez, 2000; Fréchet *et al.*, 2001). Em relação às células tumorais, a concentração de GSH pode ser responsável pela resistência ou sensibilidade destas células, frente a agentes antineoplásicos (Chen *et al.*, 1998). Autores têm demonstrado que as espécies reativas de oxigênio apresentam importante função biológica na transdução de sinal celular (Lander, 1997; Forman *et al.*, 2004). Na literatura há vários relatos da sensibilidade de diferentes macromoléculas e, conseqüentemente de vias de sinalização frente a estas espécies. Esta ação pode ser mediada diretamente pelas espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ROS/ERNS) ou através da geração de mediadores bioativos (Kehrer, 2000). As ROS também afetam a sinalização via cálcio, a atividade de enzimas antioxidantes, transportadores de íons, genes relacionados com o crescimento celular e várias quinases da família das proteínas quinases ativadas por mitógenos. Os efeitos das ROS numa via de sinalização podem ser negativos ou positivos. Hensley e colaboradores (2000) demonstraram que o  $H_2O_2$  poderia ser sintetizado endogenamente em certos tipos celulares em resposta à citocinas ou fatores de crescimento, atuando como segundo mensageiro e estimulando cascatas de proteínas quinases acopladas com a expressão de genes envolvidos em processos inflamatórios ou no controle do ciclo celular. Sundaresan e colaboradores (1995) demonstraram que a ligação do fator derivado de plaquetas (PDGF) ao seu receptor levou à produção de peróxido de hidrogênio, que foi inibida pela expressão intracelular da catalase.

Estudos subsequentes, mostraram também que o  $H_2O_2$  atua de forma transiente, por inibir proteínas tirosina fosfatases (PTPs), as quais são altamente sensíveis à oxidantes (Heffetz e Zick, 1989; Monteiro e Stern, 1996; Denu e Tanner, 1998; Allen e Tresini, 2000; Thomas e Mallis, 2001). Este efeito é transiente, pois a presença de antioxidantes como GSH e tioredoxina restauram a atividade da PTP.

Em condições fisiológicas existem vários mecanismos de defesa celulares contra a ação dos oxidantes, tais como: enzimas (superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase e redutase), moléculas contendo tióis (GSH e tioredoxina) e vitaminas (Gaté *et al* 1999).

Tendo em vista que flavonóides e diterpenos podem alterar o estado redox celular, este trabalho teve como objetivo avaliar a capacidade de indução da diferenciação e apoptose das células da leucemia mielóide aguda (HL60) por flavonóides (apigenina, naringina, taxofolina, catequina, morina e quercetina) e desidrocrotonina. Além disto objetivos, correlacionar este(s) efeito(s) com a alteração do estado redox celular e atividade das proteínas tirosina fosfatases destas células.

## **2. METODOLOGIA**

### **2.1. Materiais**

Flavonóides (apigenina, naringina, taxofolina, catequina, morina e quercetina) foram obtidos da Sigma. A desidrocrotonina foi gentilmente cedida pelo Prof. Nelson Durán (IQ/UNICAMP).

### **2.2. Métodos**

#### **2.2.1. Cultura das células**

O cultivo das células HL60 foi realizado em meio RPMI, contendo 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de sulfato de estreptomicina, suplementado com 10% de soro fetal bovino e 300.000 células/mL. As células HL60 foram cultivadas em garrafas de 50 mL (300.000 células/mL), tratadas com as drogas com concentração equivalente ao IC<sub>50</sub> (200 µM), incubadas a 37°C sob atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub>. As células foram tratadas por 24h ou 72h com os compostos e em seguida foram realizados os experimentos para avaliação da diferenciação, apoptose e estado redox celular.

### 2.2.2. Determinação do estado redox

Dosagem da Glutathiona reduzida (Torsoni e Ogo, 1998): A concentração de glutathiona reduzida das células HL60 foi determinada após tratamento dessas células por 24h. As células ( $3 \times 10^5$ ) foram lavadas com solução fisiológica e lisadas com água. Aos 2 mL do lisado foram adicionados 3 mL de solução precipitante [1,67g de ácido metafosfórico glacial, 0,2g de ácido etilenodiamino tetracético (EDTA) e 30g de NaCl em 100 mL de água destilada. Depois de 5 min., à temperatura ambiente, a mistura foi centrifugada, restando o GSH no sobrenadante (extrato). O meio de reação continha 1,6 mL de tampão  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,2 M/pH 8,0 e 0,2 mL de DTNB 0,5 mM [5,5'-ditio-bis(2-nitrobenzóico)] (2 mg em 10 mL de citrato de sódio 1%) e 0,4 mL de extrato em um volume final de 2 mL. A absorbância foi medida a 412 nm, contra um controle que continha 1,8 mL de tampão  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,2M/pH 8,0 e 0,4 mL (2 mL de água e 3 mL de solução precipitante). O coeficiente de extinção molar para o cálculo da concentração de GSH reduzida foi de  $13,6 \text{ mM}^{-1}$  (Beutler, 1975; Torsoni e Ogo, 1998).

Determinação da atividade da glutathiona redutase (Jagt, *et al.*, 1997): A atividade da enzima foi determinada em meio de reação contendo tampão fosfato de potássio (0,1 M), pH 7,0, EDTA (2 mM), NADPH (0,1 mM) e GSSG (1 mM). A reação foi monitorada a 340 nm.

Determinação da atividade da tioredoxina redutase (Luthman e Holmgren, 1982): A atividade da enzima foi determinada através da habilidade da mesma em reduzir pontes dissulfetos da insulina. O meio de reação continha tampão hepes 1 M (pH 7,6), EDTA 0,2 M, NADPH (40 mg/mL) e insulina (10 mg/mL) e o extrato das células HL60. A reação foi iniciada com adição da tioredoxina oxidada, após 20 min. a reação foi paralisada pela adição de DTNB (0,4 mg/mL) e cloreto de guanidina (6 M) em Tris-HCl 0,2 M (pH 8,0). A absorbância foi medida a 405 nm. O resultado foi expresso como nmol de NADPH reduzido/mg de proteína e representado no gráfico como atividade relativa.

### 2.2.3. Avaliação do tipo de morte celular

Dosagem das atividades das caspases: As dosagens foram realizadas colorimetricamente utilizando como substratos DEVD e LEHD para as caspases 3 e 9, respectivamente.

Alteração da assimetria da membrana plasmática: As células HL60 foram incubadas por 24 ou 72h com a desidrocrotonina e/ou flavonóides e foram lavadas duas vezes com PBS gelado.  $1 \times 10^5$  células foram ressuspensas uma vez em 200  $\mu$ L de tampão de ligação (Binding Buffer) (0,1 M hepes, pH 7,4 , 14 M NaCl, 25 mM  $\text{CaCl}_2$ ) e a anexina V-FITC (5  $\mu$ L) e iodeto de propídio (5  $\mu$ L) foram adicionados. As células foram incubadas por 15 minutos à temperatura ambiente no escuro e subseqüentemente diluídas com 400  $\mu$ L de do mesmo tampão para análise no citômetro de fluxo. A análise bivariada foi feita num FACS Calibur (Becton Dickinson, Mountain View, USA) equipado com um laser simples emitindo excitação de luz a 488 nm (Fadok *et al.*, 1992a).

Método da difenilamina (Zhu *et al.*, 1998): As células ( $5 \times 10^6/\text{mL}$ ) foram coletadas e lisadas em 250  $\mu$ L de tampão de lise (Tris-HCl 5 mM; triton X-100 0,5% e EDTA 20 mM). Após a separação do DNA fragmentado da cromatina intacta, o sobrenadante foi transferido para outro tubo e adicionado 20  $\mu$ L de ácido perclórico 6 M. O precipitado foi dissolvido em 500  $\mu$ L de tampão TE (Tris HCl 10 mM e EDTA 0,1 mM) e tratado com igual volume de ácido tricloro acético 10%. Após centrifugação o precipitado foi ressuspendido em 250  $\mu$ L de ácido tricloro acético 5% e a amostra fervida por 15 min. Logo após foram adicionados 20  $\mu$ L de ácido perclórico 6 M. Em todas as amostras foram adicionados 500  $\mu$ L da seguinte solução: difenilamina 15 mg/mL, ácido sulfúrico concentrado 15  $\mu$ L/mL e acetaldeído 15  $\mu$ g/mL; esta mistura foi incubada a 37°C por 18h e a absorbância lida em 595 nm. A porcentagem de DNA fragmentado foi calculada pela fórmula:

$$\% \text{ DNA fragmentado} = \frac{100 \times \text{DNA fragmentado (sobrenadante)}}{\text{DNA fragmenado (sobrenadante)} + \text{DNA (precipitado)}}$$

### 3.2.4. Diferenciação

Redução do NBT: As células HL60 tratadas com desidrocrotina, flavonóides e metilprednisolona foram centrifugadas e ressuspensas com 100 µL de NBT (nitroblue tetrazolium – 4 mg/mL) e 200 µL de acetato de tetradecanoilforbol (2 µg/mL). Após incubação de 20 min. a 37°C; a reação foi interrompida com 200 µL de HCl 1 M, seguida de centrifugação e o formazan (produto de redução do NBT) presente no precipitado foi solubilizado com 600 µL de dimetilsulfóxido e a absorbância medida a 570 nm (Kohroki *et al.*, 1998).

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1. Determinação da Diferenciação Celular

Os mecanismos de diferenciação de células mielóides são extremamente complexos e envolvem vários eventos regulatórios dependendo do indutor. Embora, as vias de indução da diferenciação não estejam elucidadas, é de consenso geral que não há uma via comum (única) para o mecanismo de ação de diferentes agentes indutores da diferenciação, incluindo alguns agentes antineoplásicos (Chénais *et al.*, 2000).

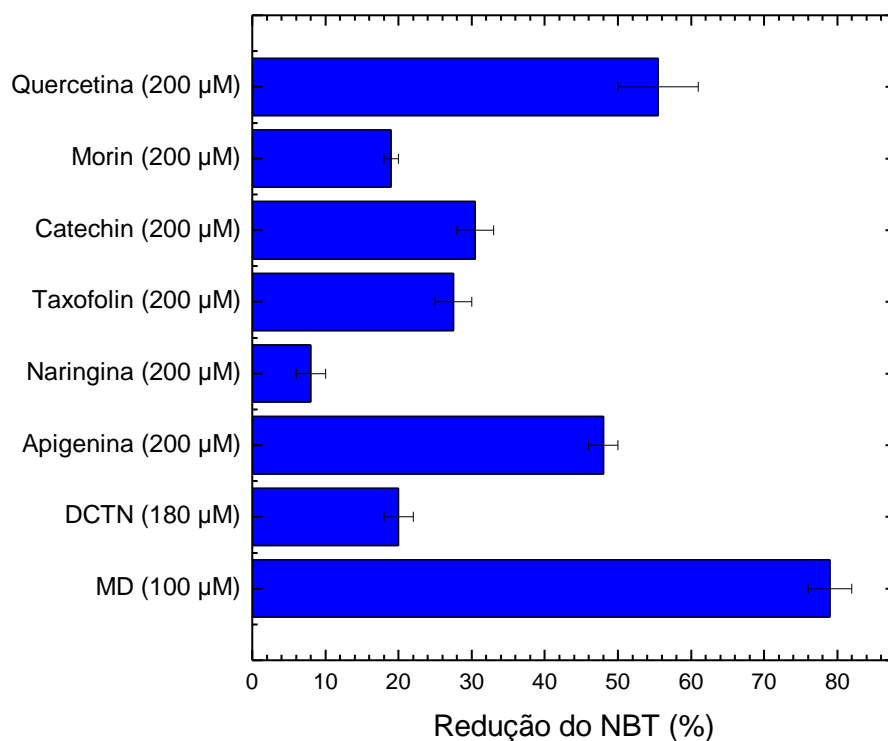
Na maioria dos estudos do mecanismo de indução da diferenciação de células leucêmicas são utilizadas as células da leucemia mielocítica humana (HL60) como modelo. Porém, os eventos moleculares da diferenciação destas células ainda não estão bem esclarecidos (Shimizu *et al.*, 1999).

As células HL60 foram incubadas com metilprednisolona (100 µM), desidrocrotina (180 µM) ou outros flavonóides (200 µM) por 24h e 72h. As concentrações dos compostos utilizadas nos experimentos foram definidas previamente, de forma que as mesmas não foram capazes de induzir morte expressiva das células, já que um dos objetivos foi analisar também a capacidade de indução da diferenciação. O processo de maturação dessas células foi monitorado pela habilidade de redução do NBT, que é um marcador típico para a



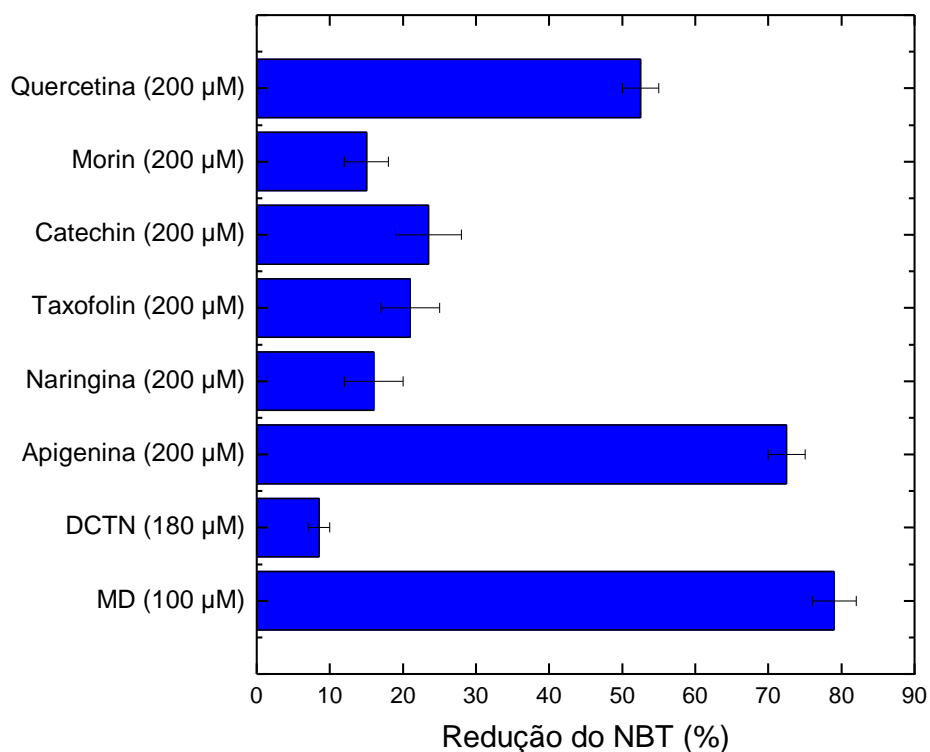
diferenciação de células da leucemia mielóide (Breitman, 1990; Kohroki *et al.*, 1998). A capacidade máxima de indução da diferenciação das células HL60 por diferentes compostos normalmente se dá em torno de 72h, uma vez que este processo requer alteração da expressão de vários genes e modificações morfológicas que são características de células maduras (Uzunoglu *et al.*, 1999).

Como mostrado na Figura 1, células tratadas com a metilprednisolona foram consideradas como controle positivo, apresentando 76,8% de diferenciação. Desidrocrotonina (tDCTN) e naringina induziram fracamente a redução do NBT (20% e 10%, respectivamente). Morina, taxofolina e catequina apresentaram praticamente o mesmo efeito na indução da diferenciação das células HL60 (~25%). No entanto, para a apigenina e quercetina observou-se um efeito significativo na indução da diferenciação destas células (~50%), principalmente quando comparamos com o efeito da metilprednisolona.



**Figura 1:** Avaliação da indução da diferenciação das células HL60 pela Desidrocrotonina (DCTN) e Flavonóides. A metilprednisolona (MD) foi utilizada como controle positivo e o controle negativo foi considerado como 0% de diferenciação e as percentagens foram calculadas através do mesmo. As células foram mantidas em cultura com os compostos, como indicado, por 24 h. O experimento foi realizado em triplicata e os pontos mostrados no gráfico representam a média e o desvio padrão.

Assim como observado após 24h de tratamento, dentre os diferentes compostos estudados, somente a apigenina e a quercetina apresentaram efeito significativo, quando a diferenciação foi analisada pela redução do NBT (Figura 2). A quercetina e a apigenina causaram cerca de 50 e 70% de redução do NBT, respectivamente. Estes valores foram próximos ao obtido para a metilprednisolona (indutor clássico da diferenciação das células HL60).



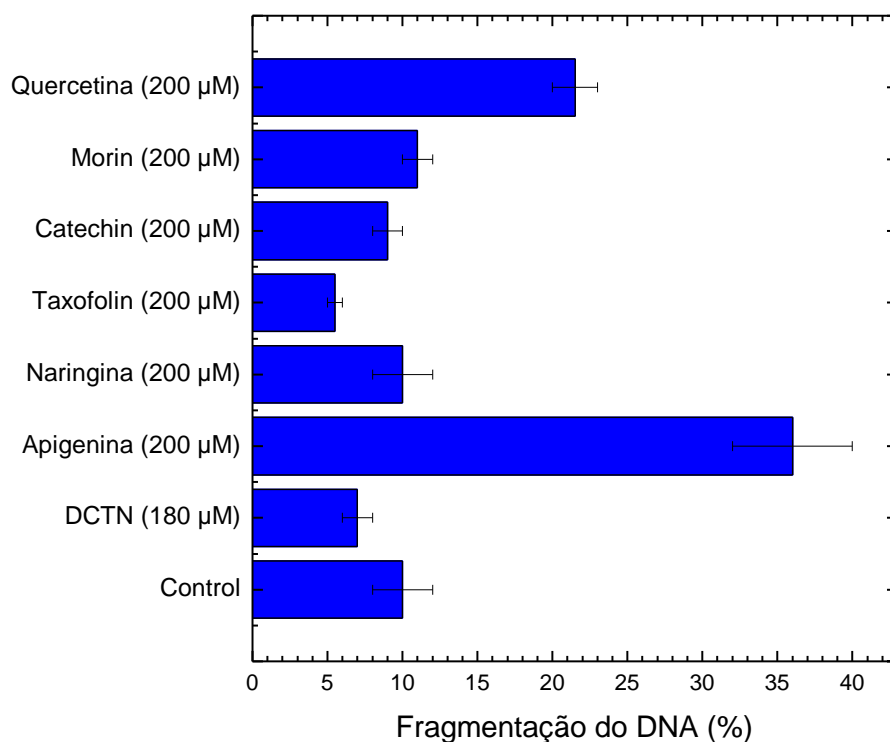
**Figura 2:** Avaliação da indução da diferenciação das células HL60 pelos flavonóides. A metilprednisolona (MD) foi utilizada como controle positivo e o controle negativo foi considerado como 0% de diferenciação e as percentagens foram calculadas através do mesmo. As células foram mantidas em cultura com os compostos, como indicado, por 72h horas. O experimento foi realizado em triplicata e os pontos mostrados no gráfico representam a média e o desvio padrão.

### 3.2. Avaliação da ocorrência de apoptose

Uma vez que a maioria dos indutores de diferenciação em células leucêmicas induz apoptose (Kohroki *et al.*, 1998) examinamos se a morte das células HL60 pelos flavonóides e desidrocrotonina se deu por apoptose. Desta forma, a morte celular foi analisada por fragmentação do DNA, atividade de

caspases (3 e 9) e integridade da membrana (dupla marcação com Anexina FITC V e iodeto de propídio).

A fragmentação do DNA foi avaliada de acordo com Zhu e colaboradores (1998). Nas células HL60 não foi observada a fragmentação do DNA após o tratamento por 24h, para todos os compostos, exceto para a quercetina e apigenina (Figura 2). Yamashita e Kawanishi (2000) demonstraram que a quercetina pode causar fragmentação do DNA mediada pela produção de peróxido de hidrogênio, com consequente formação de 8-oxo-7,8-dihidro-2'-deoxiguanosina, culminando com a apoptose ou mutações.



**Figura 3:** Avaliação da indução de apoptose das células HL60 por Desidrocrotonina (DCTN) e Flavonóides. A indução de apoptose foi avaliada através da determinação da fragmentação do DNA pelo método da difenilamina modificado por Zhu e colaboradores (1998). O experimento foi realizado em triplicata e os pontos mostrados no gráfico representam a média e o desvio padrão.

Na literatura há evidências de que apoptose nem sempre é necessariamente acompanhada por fragmentação do DNA (Cohen *et al.*, 1992). A dupla marcação das células com anexina V conjugada com isotiocianato de fluoresceína (FITC) e iodeto de propídio (PI) em associação com citometria de fluxo tem mostrado ser um método simples, rápido e valioso para a quantificação da apoptose (Vermes *et al.*, 1995). A ligação da anexina V detecta a perda da assimetria dos fosfolipídios de membrana devido à exposição da fosfatidilserina no lado externo da membrana plasmática, que ocorre na fase precoce da apoptose (Martin *et al.*, 1995). Além disso, uma forte correlação entre a ligação da anexina V e mudanças morfológicas celulares tem sido reportada (Homburg *et al.*, 1995). A concomitante marcação com iodeto de propídio (PI) fornece informações adicionais sobre este sistema de ensaio, por identificar células com perda da integridade de membrana, que é característica de fases tardias da morte celular (Schindl *et al.*, 1998). Então, para discriminar entre células apoptóticas e necróticas, o ensaio de ligação da anexina V-FITC foi combinado com o PI (corante vital).

Os resultados obtidos na análise do tipo de morte celular por citometria de fluxo, mostraram que os flavonóides foram mais eficazes na indução de morte celular por apoptose do que a desidrocrotonina, nas condições experimentais utilizadas (Tabela 1).

Em relação à atividade das caspases 3 e 9, observou-se uma alteração significativa, quando as células HL60 foram tratadas com a apigenina e quercetina (200  $\mu$ M). Os outros flavonóides e a desidrocrotonina, não afetaram a atividade destas proteases (Figura 3).

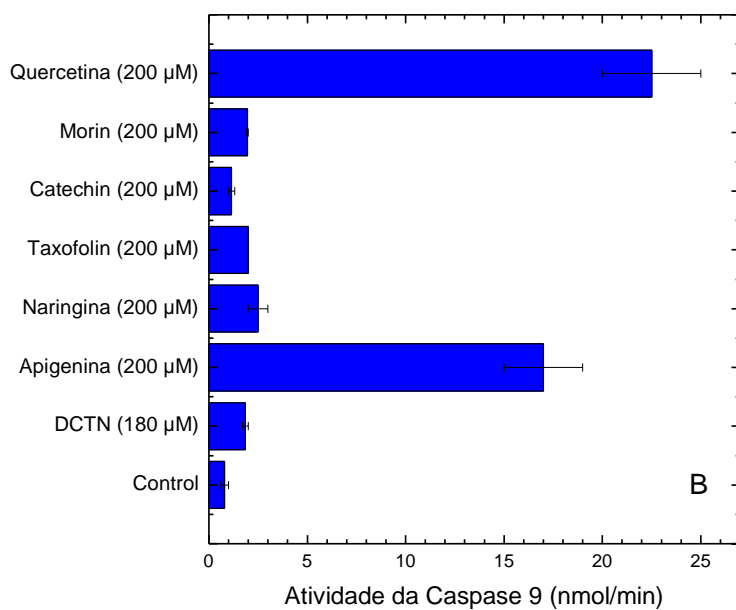
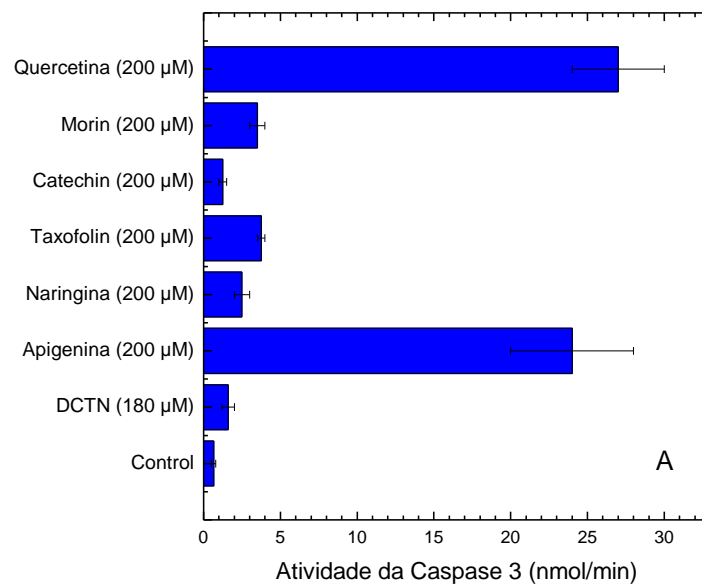
A caspase 3 apresenta importante papel na execução da apoptose, uma vez que a mesma induz a fragmentação internucleossomal (Liesveld *et al.*, 2003). Portanto, nossos resultados mostram uma relação entre fragmentação do DNA e atividade da caspase 3, pois quando as células HL60 foram tratadas com os flavonóides, observamos maior eficiência na fragmentação do DNA e ativação da caspase 3 para quercetina e apigenina (Figuras 2 e 3). Vale ressaltar que a

caspase 9 (caspase iniciadora) também se mostrou ativa nas células tratadas com a apigenina e quercetina (Figura 3B).

**Tabela 1:** Avaliação da indução de apoptose das células HL60 por flavonóides e desidrocrotonina.

Composto	Positividade da ligação da Anexina FITC e Iodeto de Propídio (%)
Apigenina	37
Naringina	8
Taxofolina	10
Catequina	5
Morina	12
Quercetina	45
Desidrocrotonina	10

Todos os compostos foram utilizados na concentração entre 180 e 200  $\mu$ M e as células HL60 marcadas simultaneamente com anexina V-FITC e PI foram analisadas no citômetro.



**Figura 4:** Efeito da Desidrocrotonina (DCTN) e dos Flavonóides na atividade das Caspases 3 **(A)** e 9 **(B)** das células HL60. A atividade das enzimas foi determinada colorimetricamente utilizando como substratos DEVD e LEHD para as caspases 3 e 9, respectivamente.

### 3.4. Determinação da glutathiona reduzida (GSH)

Os radicais livres podem ser produzidos em níveis fisiológicos estando envolvidos em processos normais tais como, divisão e diferenciação celular. No entanto, devido ao fato dos mesmos poderem causar danos nos ácidos nucleicos, proteínas ou fosfolipídios de membrana, vários processos patológicos estão relacionados com alterações no estado redox celular (Charest *et al.*, 1993; Kyriakis *et al.*, 1994; Mertens *et al.*, 1996; Allen e Tresini, 2000).

A resposta antioxidante celular define o mecanismo de ação dos radicais livres, pois dependendo da concentração dos mesmos, pode haver sinalização da diferenciação e morte celular por apoptose ou necrose (Allen e Tresini, 2000).

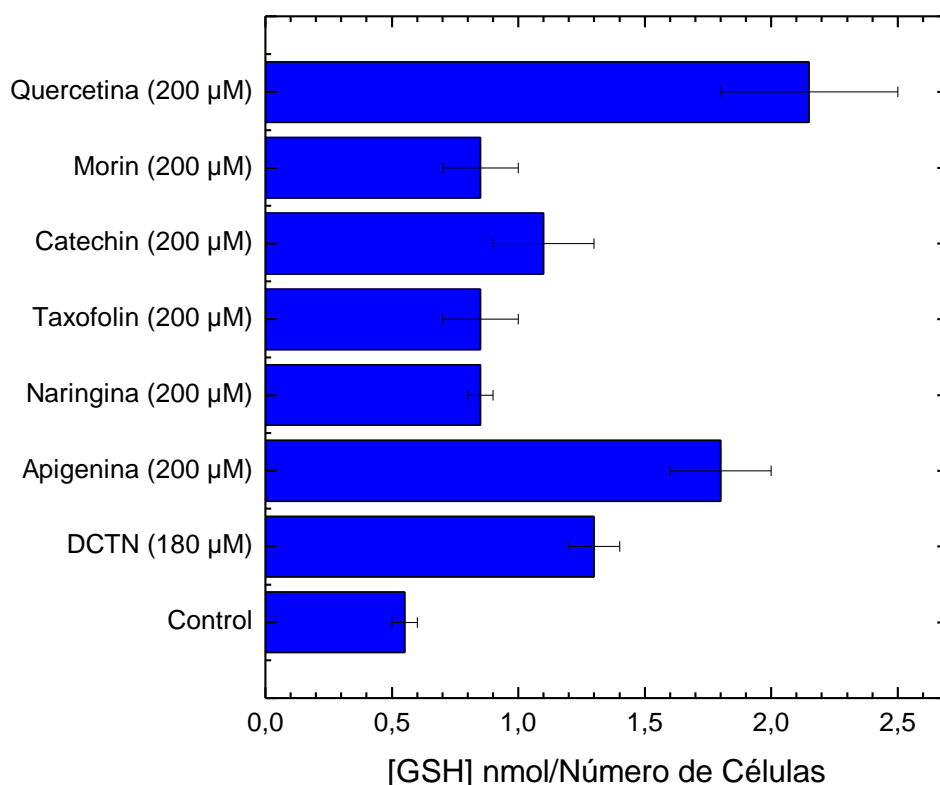
A concentração celular de GSH nas células HL60 tem sido previamente determinada (Xu e Thornalley, 2001). As células HL60 incubadas por 24h em presença de desidrocrotonina (180  $\mu$ M) e flavonóides (200  $\mu$ M) tiveram o nível de GSH aumentado em relação ao controle (Figura 4).

O efeito da desidrocrotonina e dos flavonóides na atividade da glutathiona redutase das células HL60 após tratamento por 24h (Figura 5). Na presença dos flavonóides, a atividade da enzima não foi significativamente alterada. Porém, na presença da desidrocrotonina observou-se uma inibição de 40% da atividade da enzima.

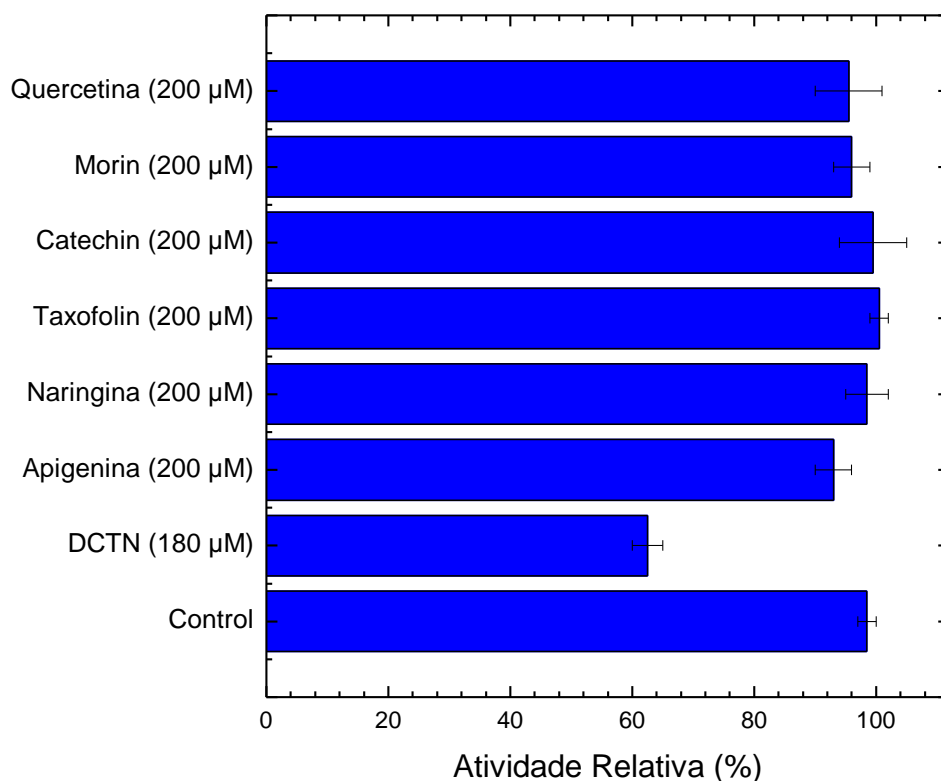
Analisando esses resultados podemos sugerir que a desidrocrotonina causou um aumento do nível de GSH das células HL60 por aumentar sua síntese, uma vez que a atividade da glutathiona redutase estava diminuída. Porém, este aumento do poder redutor não foi capaz de impedir o processo necrótico das células. Vale ressaltar que, as sesquiterpenos lactonas funcionam como aceptores de Michael podendo reagir com grupamentos SH, nitrogênio 7 da guanina e inclusive com a glutathiona (Costa *et al.*, 1999; Freire *et al.*, 2003). Desta forma, podemos dizer que o aumento da concentração do GSH nas células tratadas com a DCTN, causou somente um aparente estado celular reduzido.



Em relação aos flavonóides, somente a apigenina e a quercetina causaram aumento da quantidade de GSH celular. Vários autores demonstraram que os polifenóis apresentam atividade antioxidante. Este fato pode explicar o nível de GSH celular próximo ao do controle e também a manutenção da atividade da glutatina redutase, quando os outros flavonóides foram utilizados.



**Figura 5:** Determinação da glutatona reduzida em células HL60. As células foram mantidas em cultura com os compostos, como indicado, por 24h. O experimento foi realizado em triplicata e os pontos mostrados no gráfico representam a média e o desvio padrão.



**Figura 6:** Determinação da atividade da glutathione redutase das células HL60. As células foram mantidas em cultura com os compostos por 24h. O experimento foi realizado em triplicata e os pontos mostrados no gráfico representam as médias e os desvios padrões.

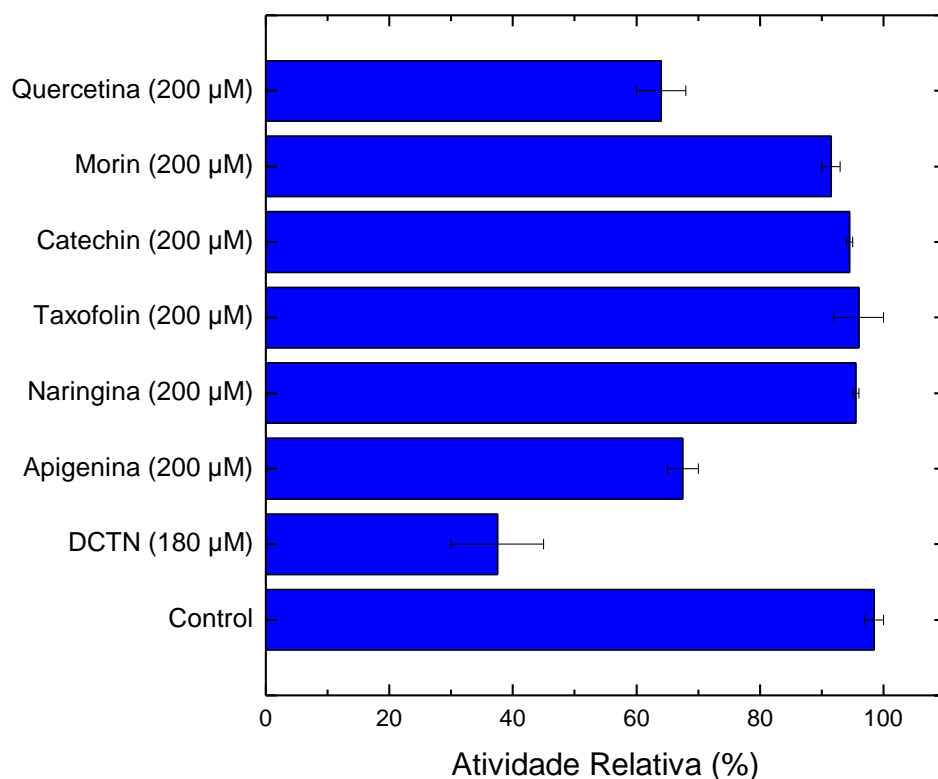
### 3.5. Efeito dos compostos na atividade da tioredoxina redutase

A figura 6 mostra claramente que a quercetina, apigenina e desidrocrotonina causaram inibição da tioredoxina redutase de 40, 30 e 60%, respectivamente. Este resultado reforça nossa hipótese que os efeitos significativos causados pela apigenina e quercetina (diferenciação e apoptose) e desidrocrotonina (necrose) se deram basicamente pela indução do estresse oxidativo possivelmente causado pela inibição da regeneração da tioredoxina reduzida.

A tioredoxina apresenta um domínio altamente conservado (Trp-Cys-Gly-Pro-Cys-Lys) sendo que os dois resíduos de cisteína apresentam importante papel na função biológica desta proteína como antioxidante. A tioredoxina é oxidada (Trx-S<sub>2</sub>) através da transferência de equivalentes redutores a substratos contendo ponte dissulfeto (X-S<sub>2</sub>), e volta ao estado reduzido [Trx-(SH)<sub>2</sub>] pela ação da tioredoxina redutase dependente de NADPH (Powis *et al.*, 2000). Nossos resultados sugerem que a inibição da tioredoxina redutase pode ter um papel crucial para a indução da apoptose de células HL60 pela apigenina e quercetina. Alguns autores têm reportado que a tioredoxina (reduzida) pode inibir o processo apoptótico (Wang *et al.*, 1997; Jordan e Reichard, 1998; Powis *et al.*, 2000). Portanto, em nosso modelo experimental, a inibição da tioredoxina redutase culminou na diminuição da tioredoxina reduzida e, conseqüentemente, a via indução da apoptose foi ativada.

Apesar da atividade da glutathione redutase não ter sido significativamente afetada pelos compostos, observamos aumento na concentração da GSH (Figura 4). Desta forma, podemos sugerir que estes três compostos causaram aumento da produção de radicais livres por diminuírem a regeneração da tioredoxina, daí a tentativa do aumento da resposta antioxidante via síntese do GSH. No entanto, este aumento na produção do GSH não foi suficiente para evitar o efeito citotóxico dos mesmos sobre as células HL60. A glutathione é uma molécula bastante abundante em células de mamíferos e tem como função reverter o estresse oxidativo (Sies, 1999). Nosso resultado sugere, portanto, que nas células HL60 tratadas com os compostos, houve uma maior síntese de GSH pela atividade aumentada da gama-glutamylcisteine sintetase ( $\gamma$ -GCS). A concentração celular de glutathione é largamente regulada pela atividade da  $\gamma$ -GCS. A expressão e/ou atividade aumentada dessa enzima está relacionada com uma maior concentração de glutathione levando, portanto a, maior resistência a agentes oxidantes (Nilson *et al.*, 1997; Thomas e Mallis, 2001).

Nossa hipótese sobre a alteração do estado redox pela apigenina e quercetina ainda é reforçada pelos relatos de Galati e O'Brien (2004) sobre a ação pró-oxidante destes dois flavonóides.



**Figura 7:** Determinação da atividade da tioredoxina redutase das células HL60. As células foram mantidas em cultura com os compostos por 24 horas. O experimento foi realizado em triplicata e os pontos mostrados no gráfico representam a média e o desvio padrão.

## 5. CONCLUSÕES

A indução da diferenciação ou da apoptose são duas importantes estratégias terapêuticas. Nossos resultados mostraram que os flavonóides apresentam efeitos variados sobre as células HL60. Neste contexto, vale ressaltar que a quercetina e a apigenina apresentaram os dois efeitos desejados a um agente quimioterápico, ou seja, expressiva indução da diferenciação das células e também apoptose.

## REFERÊNCIAS

- Allen R.G., Tresini M. Free Rad. Biol. Med., v.28, p.463-499.2000
- Beutler J.A., McCall K.L., Herbert K., Johnson T., Shoemaker R. H., Boyd M.R. Phytochemistry., v.55, p.233-236. 2000
- Breitman T.R. Method. In Enzymol. v.190, p.118-130.1990
- Charest D.L., Mordret G., Harder K.W., Jirik F., Pelech F. Mol. Cell Biol., v.13, p.4679-4690. 1993
- Chen X., Carystions G.D., Batist G. Chem-Biol. Interac., v.111, p.263-275. 1998
- Chénais, B., Andriollo, M., Guiraud, P., Belhoussine, R. and Jeannesson, P. Free Radical Biol. Med. v.28, n.1, p.18-27.2000
- Cohen P. Trends Biochem. Sci., v.22, p.245-251. 1997.
- Costa A.M.L., Silva J.C.R., Rao V.S.N., Maciel M.A.M , Pinto A.C. Phytotherapy Res. v.13, p.689-691. 1999.
- Denu J.M. ,Tanner K.G. Biochemistry, v.37: p.5633-5642. 1998.
- Fadok V. A., Voelker D.R., Campbell P.A., Cohen J.J., Bratton G.L., Henson P.M. J. Immunol. v.148,p. 2207-2216. 1992a.
- Finkel T. Redox-dependent signal transduction. FEBS Lett. v.476, p.52-54. 2000.
- Fréchet M., Canitrot Y., Cazaux C., Hoffmann J. Febs Lett., v.505: p.229-232.2001.
- Freire A.G., Melo P.S., Haun M., Dúran N., Aoyama H., Ferreira C.V. Planta Medica, v.69, p.67-69. 2003

- Galati G., O'Brien P.J. Free Rad. Biol. Med. v.37: p.287-303.2004
- Gaté L., Paul J., Nguyen Ba G., Tew K.D., Tapiero, H. Biomed. Pharmacother., v.53,p. 169-180. 1999.
- Heffetz D., Zick Y.J. Biol. Chem., v.264, p.10126-10132. 1989.
- Hensley K., Robinson K.A, Gabbita, S.P., Salsman, S., Floyd, R.A. Free, Rad. Biol. Med., v.28, p.1456-1462.2000.
- Homburg C.H., Haas M., von dem Borne A.J., Reutelingsperger, C. P., Roos, D. Blood, v.85, p.532-540. 1995.
- Jagt D.L.V., Hunsaker L.A, Jagt T.J.V. Biochem. Pharmacol., v.53, p.1133-1140. 1997.
- Jordan A., Reichard P. Ann. Rev. Biochem., v.67, p.71-98. 1998.
- Kohroki J., Muto T., Itoh N., Inada A., Tanaka K. Leuk. Res., v.22, p.405-412. 1998.
- Kyriakis J.M., Banerjee P., Nikolakaki E., Daí T., Rubie E.A, Ahmad M.F., Avruch J., Woodgett J.R. Nature, v.369,p.156-160. 1994.
- Liesveld J.L., Abboud C.N., Lu C., McNair II C., Menon A., Smith A., Rosell K., Rapoport A.P. Leuk. Res. v.27, p.517-527. 2003.
- Luthman M., Holmgren A Biochemistry, v.21, p.6628-6633. 1982
- Martin S J., Reutelingsperger C.P.M., McGahon A.J., Rader J.A., vanSchie R.G. A., LaFace D.M., Green D.R.. J. Exp. Med. v.182, p.1545-1556. 1995.
- Matés J.M., Sánchez-Jiménez F.M. Inter. J. Biochem. Cell Biol., v.32, p.157-170. 2000.
- Mertens S., Craxton M., Goedert M. FEBS Lett., v.383, p.273-276. 1996.
- Monteiro, H. P., Stern, A. Free Radic. Biol. Med. v.21: p.323-333. 1996.
- Nilson E.; Ghassemifar R., Brunk U.T. Lysosomal heterogeneity between and within cells with respect to resistance against oxidative stress. Histochem. J. v.29, p.857-865. 1997.
- Powis G., Mustacich D., Coon, A Free Rad. Biol. Med., v.29,p. 312-322. 2000.
- Schindl A., Klosner G., Hönigsmann H., Jori G., Calzavara-Pinton P.C., Trautinger F. J. Photoch. Photobiol. B. Biol. .v.44,p.97-106. 1998.
- Shimizu T., Oka Y., Awai N., Takeda K. Leukemia Res. 23: 901-907. 1999.

Sies H. Glutathione and its role in cellular functions. Free Radic. Biol. Med. v.27,p. 916-921. 1999.

Sundaresan M.; Yu Z.X.; Ferrans V.J.; Irani K., Finkel T. Science, v.270, p. 296-299. 1995.

Thomas J.A., Mallis R.J. Exper. Gerontol., v.36, p.1519-1526. 2001

Torsoni M.A., Ogo S.H. Biochem. Mol. Biol., v.46, p.147-156. 1998.

Uzunoglu S., Uslu R., Tobu M., Saydam G., Terzioglu E., Buyukkececi F., Omay, S.B. Leuk. Res. v.23, p.507-512. 1999.

Vermes I., Haanen C., Steffens-Nakken H., Reutelingsperger C.J. Immunol. Methods. v.184 p.39-51.1995.

Wang J., Kobayaski M., Sakurada K., Imamura M., Moriuchi T., Hosokawa M. Blood, v.89, p.2480-2487.1997

Xu K., Thornalley P. J. Biochem. Pharmacol. 61: 165-177. 2001

Yamashita N., Kawanishi S. Free Rad. Res., v.33, p.623-633. 2000

Zhu W.H., Majluf-Cruz A., Omburo G. A. Life sci. v.63, n.4, p.265-274. 1998

### 3. DISCUSSÃO GERAL

No presente trabalho, foram abordados 2 aspectos: indução de morte das células leucêmicas por calix[6]areno, flavonóides e diterpenolactona e contribuição da proteína tirosina fosfatase de baixo peso molecular (LMWPTP) para a resistência de células leucêmicas. Para facilitar a leitura, a discussão será dividida em três partes, as quais são referentes aos 3 capítulos apresentados:

#### ***Ação antiproliferativa do calix[6]areno em células da leucemia eritroblástica***

A leucemia mielóide crônica (CML) é caracterizada principalmente pelo gene de fusão BCR-ABL1. Apesar de alguns agentes quimioterápicos mostrarem bons resultados no tratamento de pacientes com leucemia (Gerber 2008; Larson e Stock 2008), a resistência a fármacos é um dos principais obstáculos para o sucesso de terapias para essa doença (Kondo *et al.*, 2005; Szakacs *et al.*, 2006). Assim, a identificação de novos agentes que apresentam potencial tóxico sobre este tipo celular é de grande interesse farmacológico.

No presente estudo, mostramos o efeito do calix[6]areno sobre duas linhagens de células da leucemia eritrocítica, a K562 (não resistente) e a Lucena-1 (fenótipo MDR). Os resultados demonstraram que o calix[6]areno apresenta efeito antiproliferativo de forma dependente de dose para ambas as linhagens. Este efeito antiproliferativo do calix[6]areno pode ser resultado da diminuição da proliferação, indução de morte celular ou ainda, a combinação dos dois. A análise por microscopia óptica mostrou variação da morfologia das células quando tratadas com calix[6]areno, as quais apresentam estruturas como bolhas ao redor das células, característica de corpos apoptóticos em formação, primeiro indício de apoptose induzida pelo calix[6]areno. Outra característica de células em apoptose é a translocação do fosfolípido fosfatidilserina (PS) da monocamada interna para a monocamada externa da membrana plasmática, expondo assim a fosfatidilserina



para o meio extracelular. A anexina V é uma proteína de 35-36 kDa que tem alta afinidade por PS, portanto, utilizando a anexina V conjugada com um fluorocromo, FITC, pudemos quantificar as células (K562 e Lucena-2) em apoptose após tratamento com o calix[6]areno. Sob o aspecto molecular, também a ativação de vias apoptóticas foi demonstrada. O calix[6]areno aumentou a razão Bax/Bcl-2, PARP clivada e expressão da pro-caspase 3, além da diminuição de c-Myc, um oncogene encontrado em diversos tipos de cânceres.

Muitos antitumorais inibem a progressão do ciclo celular, por exemplo, vinblastina, taxol e cisplatina bloqueiam o ciclo celular na fase G2/M e o metotrexato inibe a fase S (Cragg *et al.*, 1997; Jordan *et al.*, 1991; Shi *et al.*, 1998). Recentemente, foi observado que o ácido pseudolárico induz parada no ciclo celular na fase G2/M em células HL60 (Guoyi Ma *et al.*, 2010). No caso específico do calix[6]areno observamos parada do ciclo celular na fase G1 para ambas linhagens, K562 e Lucena-1, quando este composto foi utilizado nas concentrações 5 e 10  $\mu$ M.

Na literatura tem sido reportado o envolvimento de vias de sinalizações importantes na transformação BCR- ABL1. Por exemplo, a ativação da via da PI3K é muito importante nessa transformação (Skorski *et al.*, 1995). Portanto, investigamos algumas moléculas sinalizadoras envolvidas com essa via em relação ao efeito do calix[6]areno. Os nossos resultados sugerem um decréscimo da via de sobrevivência das células K562 e Lucena-1 por uma ativação da atividade da fosfatase PTEN e uma inibição da atividade da Akt. A PTEN é um regulador negativo da atividade da Akt, sugerimos que poderá estar ocorrendo um decréscimo da razão proliferação/sobrevivência das células leucêmicas. Outro fator importante é que a transformação de células hematopoiéticas pelo oncogene tirosina quinase BCR-ABL1 está associada com o aumento crônico de ROS intracelular (Rodrigues *et al.*, 2008). Nossos resultados demonstraram um aumento na expressão das enzimas antioxidantes induzida pelo calix[6]areno, sugerindo que esse aumento poderá causar uma modulação negativa sobre a

tirosina quinase BCR-ABL1 e consequentemente, sobre a razão proliferação/sobrevivência em ambas células leucêmicas.

Em conjunto, os dados obtidos sugerem que o calix[6]areno apresenta grande potencial para combater a resistência de células cancerígenas. Outro ponto que vale ser mencionado é que, neste estudo, foi utilizado um calixareno sem nenhuma modificação química. Na literatura existem relatos sobre o potencial antitumoral de calixarenos, mas nestes casos foram utilizados calixaremos modificados quimicamente (Blaskovic, 2000; Sebti e Hamilton, 2000; Dings *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2006).

### ***Contribuição da proteína tirosina fosfatase de baixo peso molecular para a manutenção da resistência da leucemia eritroblástica humana***

A aquisição de resistência a agentes quimioterápicos ainda constitui o principal obstáculo no tratamento de pacientes com câncer, especialmente nos casos de neoplasias hematológicas onde ao contrário do que ocorre com tumores sólidos, o tratamento cirúrgico mostra-se pouco viável fazendo com que a quimioterapia ainda seja a principal conduta terapêutica de escolha (Kondo *et al.*, 2005; Szakacs *et al.*, 2006). Por esta razão, a elucidação dos mecanismos que conferem resistência a fármacos com diferentes alvos e estruturas químicas, MDR, e o desenvolvimento de terapias mais eficazes para o tratamento do câncer, têm sido as principais metas dos pesquisadores da área, nos últimos 35 anos.

A resistência a drogas quimioterápicas pode se manifestar clinicamente logo nos estágios iniciais de tratamento, constituindo o fenômeno de resistência de novo ou ser induzida durante a quimioterapia quando células mais sensíveis são eliminadas. Em conseqüência, observa-se que resistência genética pode ser induzida tanto pelo próprio tratamento com agentes anti-neoplásicos ou emergir como um evento espontâneo (Kappelmayer *et al.*, 2004; Nobili *et al.* 2006). Como um mecanismo de caráter multifatorial, o fenótipo MDR tem sido associado a uma série de alterações celulares incluindo alterações no ciclo celular, aumento na

eficiência de reparo do DNA, redução de apoptose e alteração no metabolismo de drogas (Szakács *et al.*, 2006). Entre os vários mecanismos identificados o mais comumente encontrado envolve o aumento do efluxo de drogas citotóxicas hidrofóbicas através de um sistema dependente de energia, mediado por membros da família de transportadores ABC (“ATP-binding cassette transporters”). Primeiramente descritos na década de 70, vários membros da família de transportadores ABC têm mostrado ser potentes indutores de MDR, destacando-se o papel da P-Gp (Hirose *et al.*, 2003; Al-Shawi *et al.* 2005).

A fosforilação de proteínas, mediada pelo balanço entre a ação de proteínas quinases (PKs) e proteínas fosfatases (PPs), é reconhecida como fator crucial na geração e regulação de sinais necessários para a sobrevivência, proliferação, diferenciação e morte celular. De fato as células respondem aos estímulos internos e externos através da ativação ou inibição de diferentes vias de sinalização intracelulares as quais agem via cascatas de reações sequenciais de fosforilação ou desfosforilação reguladas pela ação de PKs e PPs, respectivamente (Ferreira *et al.*, 2006; Tonks NK 2005; van Huijsduijnen *et al.*, 2002). Em particular, a ação integrada de proteínas tirosina quinases (PTKs) e proteínas tirosina fosfatases (PTPs) no controle da fosforilação reversível de proteínas em resíduos de tirosina, é reconhecida como fator crítico na regulação da transdução de sinais em condições normais e patológicas. Em conjunto, PTPs e PTKs regulam a fosforilação reversível de proteínas em resíduos de tirosina, evento de fundamental importância no controle de diversos processos fisiológicos tais como crescimento e diferenciação celular, metabolismo, alterações de citoesqueleto, ciclo celular e respostas imunológicas, entre outras. De acordo, o descontrole nas atividades de PTKs e PTPs está associado ao desenvolvimento de inúmeras doenças genéticas ou adquiridas tais como diabetes, câncer e autoimunidades (Souza *et al.*, 2009; Tautz and Mustelin 2007; Ferreira *et al.*, 2006; Andersen *et al.*, 2004; Malentacchi *et al.*, 2005).

Neste trabalho mostramos, pela primeira vez, que a LMWPTP pode apresentar relação com a manutenção da resistência a quimioterápicos.

Estudos demonstraram que a atividade da LMWPTP está fortemente correlacionada ao desenvolvimento e progressão de tumores (Marzocchi *et al.*, 2007; Kikawa *et al.*, 2002; Chiarugi *et al.*, 2004). Malentacchi e colaboradores (2005) avaliaram os níveis de expressão de LMWPTPs em amostras de tumores de mama, cólon, pulmão e em neuroblastoma. Os resultados mostraram aumento na expressão de LMWPTPs na maioria das amostras analisadas indicando também a existência de significativa correlação entre os níveis de expressão de LMWPTPs e as principais características clínico-patológicas comuns a cada tipo de câncer. Adicionalmente, o aumento na expressão de LMWPTPs demonstrou ser indicativo de prognóstico menos favorável, constituindo marcador da agressividade tumoral.

As células Lucena-1 apresentam alta expressão da P-Glicoproteína e também contém altos níveis de LMWPTP. Observamos que o silenciamento da LMWPTP nas células Lucena-1 causou uma sensibilização destas células frente aos quimioterápicos vincristina e Gleevec. Outra observação interessante foi que quando as células K562, inicialmente não resistentes, foram transfectadas com um plasmídeo contendo o gene da LMWPTP, se tornaram menos sensíveis à vincristina. Nossos dados apontam a LMWPTP como um importante mediador da resistência e que este papel pode estar relacionado com o controle da expressão da Src.

### ***Modulação do status redox: implicações na ação de antitumorais como indutores da diferenciação e apoptose de células leucêmicas***

Nesse trabalho avaliamos o potencial de flavonóides e desidrocrotonina em induzirem diferenciação e apoptose de células da leucemia mielóide aguda humana.

Os mecanismos de diferenciação de células mielóides são extremamente complexos e envolvem vários eventos regulatórios dependendo do indutor.

Embora as vias de indução da diferenciação não estejam bem elucidadas, é consenso geral que não há uma via comum (única) para o mecanismo de ação de vários agentes indutores da diferenciação, incluindo alguns agentes antineoplásicos (Chénais *et al.*, 2000).

Na maioria dos estudos do mecanismo de indução da diferenciação de células leucêmicas são utilizadas as células da leucemia mielocítica humana (HL60) como modelo. Apesar de os eventos moleculares da diferenciação destas células ainda não estarem bem esclarecidos (Shimizu *et al.*, 1999).

Neste trabalho a diferenciação das células HL60 foi monitorado pela habilidade de redução do NBT, o qual é um marcador típico para a diferenciação de células da leucemia mielóide (Breitman, 1990; Kohroki *et al.*, 1998). Para a apigenina e quercetina observou-se um efeito significativo na indução da diferenciação destas células (~50%), principalmente quando comparamos com o efeito da metilprednisolona (controle positivo).

No estágio final do processo de diferenciação pode ocorrer ativação de vias apoptóticas (Kohroki *et al.*, 1998). Em acordo, observamos que a apigenina e quercetina também induziram apoptose das células HL60.

Os radicais livres podem ser produzidos em níveis fisiológicos estando envolvidos em processos normais tais como, divisão e diferenciação celular. No entanto, devido ao fato dos mesmos poderem causar danos nos ácidos nucleicos, proteínas ou fosfolipídios de membrana, vários processos patológicos estão relacionados com alterações no estado redox celular (Charest *et al.*, 1993; Kyriakis *et al.*, 1994; Mertens *et al.*, 1996; Allen e Tresini, 2000). A resposta antioxidante celular define o mecanismo de ação dos radicais livres, pois dependendo da concentração dos mesmos, pode haver sinalização da diferenciação e morte celular por apoptose ou necrose (Allen e Tresini, 2000). Na presença da quercetina e apigenina observamos um aumento da concentração de GSH e diminuição da atividade da tioredoxina redutase.

Nossos resultados mostraram que os flavonóides apresentam efeitos variados sobre as células HL60. Neste contexto, vale ressaltar que a quercetina e

a apigenina apresentaram os dois efeitos desejados a um agente quimioterápico, ou seja, expressiva indução da diferenciação das células e também apoptose.

## **CONCLUSÃO GERAL**

## **4. CONCLUSÃO GERAL**

Os avanços científicos têm contribuído de forma inestimável para a terapia de diversas doenças. Sob esse aspecto, a visão dos profissionais de saúde, pesquisadores, bem como dos órgãos que regulamentam o lançamento de novos fármacos também tem sofrido mudanças positivas. Destacamos aqui, o novo objetivo do FDA, em relação a quimioterápicos, que é garantir a qualidade de vida do paciente. Isto somente será possível com a identificação de alvos moleculares bem como definição do mecanismo de ação do candidato a fármaco no microambiente celular. Esse trabalho, além de atender a essa nova demanda, permitiu sob o ponto de vista da transdução de sinal, a identificação da LMWPTP como um alvo em potencial para combater a resistência de células leucêmicas e calixareno como modulador químico da sobrevivência e agressividade destas células.



## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abalea V., Cillard J., Dubos M.P., Sargent O., Cillard P., Morel I. Free Rad. Biol. Med., v.26, p.1457-1466.1999

Al-Shawi M.K., Omote H. The remarkable transport mechanism of P-Glycoprotein: a multidrug transporter. J Bioenerg Biomembr, v.37, n.6, p.489-96. 2005.

Andersen J.N., P.G. Jansen, S.M. Echwald, O.H. Mortensen, T. Fukada, R. Del Vecchio, N.K. Tonks, N.P. Moller. A genomic perspective on protein tyrosine phosphatases: gene structure, pseudogenes, and genetic disease linkage. Faseb J, v.18, n.1, p.8-30. 2004.

Anglade P.S. Vyas F. Javoy-Agid M.T. Herrero Michel P.P., Marquez J., Mouatt-Prigent A., Ruberg M., Hirsch E.C., Agid Y. Apoptosis and autophagy in nigral neurons of patients with Parkinson's disease. Histol Histopathol, v.12, n.1, p.25-31. 1997.

Aoyama H. Silva T.M.A., Miranda M. A., Ferreira C.V. Proteínas tirosina fosfatases: propriedades e funções biológicas. Quim Nova, v.26, p.896-900. 2003.

Assefa Z., Vantieghem A., Garmyn M., Declercq W., Vandenabeele P., Vandenheede J.R., Bouillon R., Merleved W., Agostinis P. p38 mitogen-activated protein kinase regulates a novel, caspase-independent pathway for the mitochondrial cytochrome c release in ultraviolet B radiation-induced apoptosis. J Biol Chem, v.275, n.28, p.21416-21. 2000.

Assuncao Guimaraes C., Linden R. Programmed cell deaths. Apoptosis and alternative deathstyles. Eur J Biochem, v.271, n.9, p.1638-50. 2004.

Arora A., Byrem T.M., Nair M.G., Strasburg G.M. Arch. Biochem. Biophys., v.373, p.102-109.2000

Bestwick C.S., Milne L. Biochim. Biophys. Acta, v.59. 2001.

Blagosklonny M., Alvarez M., Fojo A., Neckers L.M. Leuk. Res., v.20, p.101-107. 1996.

Blaskovic M.A., Lin Q., Delarue F.L., Sun J., Park HS. Design of GFB-11, a platelet derived growth factor binding molecule with antiangiogenic and anticancer activity against human tumors in mice. Nat Biotechnol, v.18, p.1065-70. 2000.

Bottini E., Bergamaschi A., Magrini A., Spina C., Ammendola L., Grassi S., Bottini N., Gloria-Bottini F. Allergy and ACP1 genetic polymorphism. Allergy Asthma Proc, v.28, n.1, p.87-92. 2007.

Bottini N., Bottini E., Gloria-Bottini F., Mustelin T. Low-molecular-weight protein tyrosine phosphatase and human disease: in search of biochemical mechanisms. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), v.50, n.2, p.95-104. 2002.

Bottini N., Gloria-Bottini F., Lucarini N., Ronchetti P.G., Fontana L. Inflammatory bowel disease: Are there gender differences in the genetics of signal transduction? A preliminary study of cytosolic low molecular weight protein tyrosine phosphatase. Dis Markers, v.16, n.3-4, p.163-6. 2000.

Bray T.M., Taylor C.G. Tissue glutathione, nutrition, and oxidative stress. Can J Physiol Pharmacol, v.71, n.9, p.746-51. 1993.

Breccia M., Alimena G. Resistance to imatinib in chronic myeloid leukemia and therapeutic approaches to circumvent the problem. Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets, v.9, n.1, p.21-8. 2009.

Bucciantini M., Chiarugi P., Cirri P., Taddei L., Stefani M., Raugei G., Nordlund P., Ramponi, G. The low Mr phosphotyrosine protein phosphatase behaves differently when phosphorylated at Tyr131 or Tyr132 by Src kinase. FEBS Lett, v.456, n.1, p.73-8. 1999.

Caselli A., Taddei, M.L., Bini C., Paoli P., Camici G., Manao G., Cirri P., Ramponi, G. Low molecular weight protein tyrosine phosphatase and caveolin-1: interaction and isoenzyme-dependent regulation. Biochemistry, v.46, n.21, p.6383-92. 2007.

Caselli A., Taddei M.L., Manao G., Camici G., Ramponi G. Tyrosine-phosphorylated caveolin is a physiological substrate of the low M(r) protein-tyrosine phosphatase. J Biol Chem, v.276, n.22, p.18849-54. 2001.

Cataldo A.M., Hamilton DJ., Barnett J.L., Paskevich P.A., Nixon R A. Properties of the endosomal-lysosomal system in the human central nervous system: disturbances mark most neurons in populations at risk to degenerate in Alzheimer's disease. J Neurosci, v.16, n.1, p.186-99. 1996.

Catarzi S., Biagioni C., Giannoni E., Favilli F., Marcucci T., Lantomasi T., Vincenzini M.T. Redox regulation of platelet-derived-growth-factor-receptor: role of NADPH-oxidase and c-Src tyrosine kinase. Biochim Biophys Acta, v.1745, n.2, p.166-75. 2005.

Chiarugi P., Buricchi F. Protein tyrosine phosphorylation and reversible oxidation: two cross-talking posttranslation modifications. Antioxid Redox Signal, v.9, n.1, p.1-24. 2007.

Chiarugi P., Fiaschi T., Taddei M.L., Talini D., Giannoni E., Raugei G., Ramponi G. Two vicinal cysteines confer a peculiar redox regulation to low molecular weight

protein tyrosine phosphatase in response to platelet-derived growth factor receptor stimulation. J Biol Chem, v.276, n.36, p.33478-87. 2001.

Chiarugi P., Taddei M.L., Schiavone N., Papucci L., Giannoni E., Fiaschi T., Capaccioli S., Raugei G., Ramponi G. LMW-PTP is a positive regulator of tumor onset and growth. Oncogene, v.23, n.22, p.3905-14. 2004.

Cole S.P., Bhardwaj G., Gerlach J.H., Mackie J.E., Grant C.E. Almquist, K. C.A. Stewart, J., Kurz, E. U. Duncan, A. M., Deeley, R. G.. Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. Science, v.258, n.5088, p.1650-4. 1992.

Colston M.J., Hailes H.C., Stavropoulos E., Hervé A.C., Hervé G., Goodworth K.J., Hill A.M., Jenner P., Hart P.D., Tascon, R.E. Antimycobacterial calixarenes enhance innate defense mechanisms in murine macrophages and induce control of Mycobacterium tuberculosis infection in mice. Infect Immun, v.72, n.11, p.6318-23. 2004.

Conforth J.W., Hart P.D., Nicholls G.A., Rees R.J.W., Stock J.A. Antituberculous effects of certain surface-active polyoxyethylene ethers. Br. J. Pharmacol. Chemother. V.10,n.1, p.73.1955.

Costa A.M.L., Silva J.C.R., Rao V.S.N., Maciel M.A.M, Pinto A.C. Phytotherapy Res. v.13, p.689-691. 1999.

Cragg G.M., Newman D.J., Snader K.M. Natural products in drug discovery and development. J Nat Prod, v.60, n.1, p.52-60. 1997.

de Fatima A., Fernandes S.A., Sabino A.A. Calixarenes as new platforms for drug design. Curr Drug Discov Technol, v.6, n.2, p.151-70. 2009.

Deininger M.W., Vieira S., Mendiola R., Schultheis B., Goldman J.M., Melo J.V.. BCR-ABL tyrosine kinase activity regulates the expression of multiple genes implicated in the pathogenesis of chronic myeloid leukemia. Cancer Res, v.60, n.7, p.2049-55. 2000.

Del Peso L., Gonzalez-Garcia M., Page C., Herrera R., Nunez G. Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. Science, v.278, n.5338, p.687-9. 1997.

Di Carlo G., Mascolo N., Izzo A.A., Capasso F. Life Sci., v.65: p.337-353. 1999

Di Cristofano A., Kotsi P., Peng Y.F., Cordon-Cardo C., Elkon K.B., Pandolfi, P. P. Impaired Fas response and autoimmunity in Pten+/- mice. Science, v.285, n.5436, p.2122-5. 1999.

Dings R.P., Chen X., Hellebrekers D.M., Van Eijk L.I., Zhang Y., Hoyer T.R., Griffioen A.W., Mayo K.H. Design of nonpeptidic topomimetics of antiangiogenic proteins with antitumor activities. J Natl Cancer Inst, v.98, n.13, p.932-6. 2006.

Druker B.J. Translation of the Philadelphia chromosome into therapy for CML. Blood, v.112, n.13, p.4808-17. 2008.

Druker B.J., Guilhot F., O'Brien S.G., Gathmann I., Kantarjian H., Gattermann N., Deininger M.W., Silver R.T., Goldman J.M., Stone R.M., Cervantes F., Hochhaus A., Powell B.L., Gabrilove J.L., Rousselot P., Reiffers J., Cornelissen J.J., Hughes T., Agis H., Fischer T., Verhoef G., Shepherd J., Saglio G., Gratwohl A., Nielsen J.L., Radich J.P., Simonsson B., Taylor K., Baccarani M., So C., Letvak L., Larson R.A.. Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. N Engl J Med, v.355, n.23, p.2408-17. 2006.

Ferguson L.R. Mut. Res., v.475, p.89-111. 2001

Ferreira C.V., Justo, G.Z. Souza A.C. Queiroz K.C. Zambuzzi W.F. Aoyama, H., Peppelenbosch, M. P.. Natural compounds as a source of protein tyrosine phosphatase inhibitors: application to the rational design of small-molecule derivatives. Biochimie, v.88, n.12, p.1859-73. 2006.

Galati G., O'Brien P.J. Free Rad. Biol. Med. v.37: p.287-303.2004

Gamet-Payrastre L., Manenti S., Gratacap M., Tullieux J., Chap H., Payrastre B. Gen. Pharmacol., v.32, p.279-286. 1999.

Gerber D.E. Targeted therapies: a new generation of cancer treatments. Am Fam Physician v.77, p.311-319. 2008.

Giles F.J., Cortes J., Jones Bergstrom D., Kantarjian H., Freedman S.J. MK-0457, a novel kinase inhibitor, is active in patients with chronic myeloid leukemia or acute lymphocytic leukemia with the T315I BCR-ABL mutation. Blood, v.109, n.2, p.500-2. 2007.

Golas J.M., Arndt K., Etienne C., Lucas J., Nardin D., Gibbons J., Frost P., Ye F. D. H. Boschelli, Boschelli, F.. SKI-606, a 4-anilino-3-quinolinecarbonitrile dual inhibitor of Src and Abl kinases, is a potent antiproliferative agent against chronic myelogenous leukemia cells in culture and causes regression of K562 xenografts in nude mice. Cancer Res, v.63, n.2, p.375-81. 2003.

Golas J.M., Lucas J., Etienne C., Golas J., Discafani C., Sridharan L., Boghaert E., Arndt K., Ye F., Boschelli D.H., Li F., Titsch C., Huselton C., Chaudhary I., Boschelli F. SKI-606, a Src/Abl inhibitor with in vivo activity in colon tumor xenograft models. Cancer Res, v.65, n.12, p.5358-64. 2005.

Gorre M.E., Mohammed M., Ellwood K., Hsu N., Paquette R., Rao P.N., Sawyers C.L. Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. Science, v.293, n.5531, p.876-80. 2001.

Griswold I.J., Macpartlin M., Bumm T., Goss V.L., O'hare T., Lee K.A., Corbin A.S., Stoffregen E.P., Smith C., Johnson K., Moseson E.M., Wood L.J., Polakiewicz R.D., Druker B.J., Deininger M.W. Kinase domain mutants of BCR-ABL exhibit altered transformation potency, kinase activity, and substrate utilization, irrespective of sensitivity to imatinib. Mol Cell Biol, v.26, n.16, p.6082-93. 2006.

Grynberg N.F., Echevarria A., Lima J.E., Pamplona S.S.R., Pinto A.C., Maciel M.A.M. Planta Med., v.65, p.687-689. 1999.

Gutsche C.D. Para uma revisão mais aprofundada sobre o desenvolvimento da química dos calixarenos. Pure & Appl. Chem. 1990.

Hantschel O., Rix U., Superti-Furga G. Target spectrum of the BCR-ABL inhibitors imatinib, nilotinib and dasatinib. Leuk Lymphoma, v.49, n.4, p.615-9. 2008.

Harborne J.B., Williams C.A Phytochemistry, v.55, p.481-504. 2000.

Hart P.D., Armstrong J.A., Brodaty E. Calixarenes with hostmediated potency in experimental tuberculosis: further evidence that macrophage lipids are involved in their mechanism of action. Infect. Immun. v.64, n.4, p.1491.1996.

Havsteen B.H. Pharmacol Ther., v.96, p.67. 2002.

Higgins C.F. ABC transporters: from microorganisms to man. Annu Rev Cell Biol, v.8, p.67-113. 1992.

Higgins C.F. Multiple molecular mechanisms for multidrug resistance transporters. Nature, v.446, n.7137, p.749-57. 2007.

Hirose M., Hosoi E., Hamano S., Jalili A. Multidrug resistance in hematological malignancy. J Med Invest, v.50, n.3-4, p.126-35. 2003.

Hiruma-Lima C.A., Gracioso J.S., Rodriguez J.A., Haun M. Nunes, D.S., Brito A.R.M.S. J. Ethn, v.69, p.229-234. 2000

Hollman P.C., Katan M.B. Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability. Food Chem Toxicol. v.37, p.937-942. 1999.

Huang F., Decillis A.P., Sawyers C.L. Dasatinib in imatinib-resistant Philadelphia chromosome-positive leukemias. N Engl J Med, v.354, n.24, p.2531-41. 2006.

Hughes T., Deininger M., Hochhaus A., Branford S., Radich J., Kaeda J., Baccarani M., Cortes J., Cross N.C., Druker B.J., Gabert J., Grimwade D.,

Hehlmann R., Kamel-Reid S., Lipton J.H., Longtine J., Martinelli G., Saglio G., Soverini S., Stock W., Goldman J.M. Monitoring CML patients responding to treatment with tyrosine kinase inhibitors: review and recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts and kinase domain mutations and for expressing results. Blood, v.108, n.1, p.28-37. 2006.

Jain M.K., Jahagirdar D.V. Effect of antituberculous calixarenes on phospholipase A2, susceptibility and on fusion of phospholipids bilayers. Biochem. J. v.227,n.3, p.789.1985.

Jeffrey M., Scott J.R., Williams A., Fraser H. Ultrastructural features of spongiform encephalopathy transmitted to mice from three species of bovidae. Acta Neuropathol, v.84, n.5, p.559-69. 1992.

John A.M., Thomas N.S., Mufti G.J., Padua R.A. Targeted therapies in myeloid leukemia. Semin Cancer Biol, v.14, n.1, p.41-62. 2004.

Jordan M.A., Thrower D., Wilson L. Mechanism of inhibition of cell proliferation by Vinca alkaloids. Cancer Res, v.51, n.8, p.2212-22. 1991.

Joske D.J. Chronic myeloid leukaemia: the evolution of gene-targeted therapy. Med J Aust, v.189, n.5, p.277-82. 2008.

Juliano R.L., Ling V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. Biochim Biophys Acta, v.455, n.1, p.152-62. 1976.

Jurgensmeier J.M., Xie Z., Deveraux Q., Ellerby L., Bredesen D., Reed J.C. Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. Proc Natl Acad Sci U S A, v.95, n.9, p.4997-5002. 1998.

Kane D.J., Ord T., Anton R., Bredesen D.E.. Expression of bcl-2 inhibits necrotic neural cell death. J Neurosci Res, v.40, n.2, p.269-75. 1995.

Kang T., Liang N. Biochem. Pharmacol., v.54, p.1013-1018. 1997.

Kantarjian H., Giles F., Wunderle L., Bhalla K., O'brien S., Wassmann B., Tanaka C., Manley P., Rae P., Mietlowski W., Bochinski K., Hochhaus A., Griffin J.D., Hoelzer D., Albitar M., Dugan M., Cortes J., Alland L., Ottmann O.G.. Nilotinib in imatinib-resistant CML and Philadelphia chromosome-positive ALL. N Engl J Med, v.354, n.24, p.2542-51. 2006.

Kappelmayer J., Simon A., Kiss F., Hevessy Z. Progress in defining multidrug resistance in leukemia. Expert Rev Mol Diagn, v.4, n.2, p.209-17. 2004.

Kawahara A., Ohsawa Y., Matsumura H., Uchiyama Y., Nagata S. Caspase-independent cell killing by Fas-associated protein with death domain. J Cell Biol, v.143, n.5, p.1353-60. 1998.

Kikawa K.D., Vidale D.R., Van Etten R.L., Kinch M.S.. Regulation of the EphA2 kinase by the low molecular weight tyrosine phosphatase induces transformation. J Biol Chem, v.277, n.42, p.39274-9. 2002.

Klco J.M., Vij R., Kreisel F.H., Hassan A., Frater J.L. Molecular pathology of myeloproliferative neoplasms. Am J Clin Pathol, v.133, n.4, p.602-15. 2010.

Kong A.N.T., Yu R., Chen C., Mandlekar S., Primiano T. Arch. Pharmacol Res., v.23: p.1-16. 2000.

Kroemer G., Galluzzi L., Vandenabeele P., Abrams J., Alnemri E.S., Baehrecke E.H., Blagosklonny M.V, El-Deiry W.S., Golstein, P. Green D.R., Hengartner M., Knight R.A., Kumar S., Lipton S.A., Malorni W., Nunez G., Peter M.E., Tschopp J., Yuan J., Piacentini M., Zhivotovsky B., Melino G. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. Cell Death Differ, v.16, n.1, p.3-11. 2009.

Kurokawa M., Kornbluth S. Caspases and kinases in a death grip. Cell, v.138, n.5, p.838-54. 2009.

Lage H. An overview of cancer multidrug resistance: a still unsolved problem. Cell Mol Life Sci, v.65, n.20, p.3145-67. 2008.

Larson S, Stock W. Progress in the treatment of adults with acute lymphoblastic leukemia. Curr Opin Hematol v.15,p.400–407.2008.

Lavie Y., Fiucci G., Liscovitch M. Upregulation of caveolin in multidrug resistant cancer cells: functional implications. Adv Drug Deliv Rev, v.49, n.3, p.317-23. 2001.

Lazzarotto M, Nachtigall F.F., Nome F. Calixarenes: receptores para reconhecimento molecular. Química nova. v. n.p.444-451.1995.

Lozzio C.B., Lozzio B.B. Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. Blood, v. 45, p.321-334. 1975.

Ma G., Chong L., Li X.C., Khan I.A., Walker L.A., Khan S.I. Selective inhibition of human leukemia cell growth and induction of cell cycle arrest and apoptosis by pseudolaric acid B. J Cancer Res Clin Oncol, 2010.

Malentacchi F., Marzocchi R., Gelmini S., Orlando C., Serio M., Ramponi G., Raugei G. Up-regulated expression of low molecular weight protein tyrosine



phosphatases in different human cancers. Biochem Biophys Res Commun, v.334, n.3, p.875-83. 2005.

Martin S.J. Trends. Cell Biol. v.3, p. 141-144. 1993.

Marzocchini R., Malentacchi F, Biagini M. The expression of low molecular weight protein tyrosine phosphatase in up-regulated in 1,2-dimethylhydrazine induced colon tumours in rats. Int J cancer, v.122, p.1675-8. 2008.

Mccubrey J.A., Steelman L.S., Abrams S.L., Bertrand F.E., Ludwig D.E., Basecke J., Libra M., Stivala F., Milella M., Tafuri A., Lunghi P., Bonati A., Martelli A.M. Targeting survival cascades induced by activation of Ras/Raf/MEK/ERK, PI3K/PTEN/Akt/mTOR and Jak/STAT pathways for effective leukemia therapy. Leukemia, v.22, n.4, p.708-22. 2008.

Melino G. The Sirens' song. Nature, v.412, n.6842, p.23. 2001.

Middleton E.J.R., Kandaswami C. The impact of plant flavonoids on mammalian biology: Implications for immunity, inflammation and cancer. In: Harborne JH, Liss AR, editors. The Flavonoids: Advances in Research Since 1986. New York: p 619–652.1993.

Modugno M., Casale E., Soncini C., Rosettani P., Colombo R., Lupi R., Rusconi L., Fancelli D., Carpinelli P., Cameron A.D., Isacchi A., Moll J.. Crystal structure of the T315I Abl mutant in complex with the aurora kinases inhibitor PHA-739358. Cancer Res, v.67, n.17, p.7987-90. 2007.

Motornaya AE A.L., Shokova E.A, Kovalev V.V. Synthesis and antiherpetic activity of N-(3-amino-1-adamantyl)calix[4]arenes. Pharm Chem J, v.40, p.68. 2006.

Nobili S., Landini I., Giglioni B., Mini E. Pharmacological strategies for overcoming multidrug resistance. Curr Drug Targets, v.7, n.7, p.861-79. 2006.

O'connor R. The pharmacology of cancer resistance. Anticancer Res, v.27, n.3A, p.1267-72. 2007.

Ong K.C., Koo H. Gen. Pharmac., v.29,p. 121-126. 1997.

Oppenheim R.W., Flavell R.A., Vinsant S., Prevette D., Kuan C.Y., Rakic P. Programmed cell death of developing mammalian neurons after genetic deletion of caspases. J Neurosci, v.21, n.13, p.4752-60. 2001.

Osaki M., Kase S., Adachi K., Takeda A., Hashimoto K., Ito H. Inhibition of the PI3K-Akt signaling pathway enhances the sensitivity of Fas-mediated apoptosis in human gastric carcinoma cell line, MKN-45. J Cancer Res Clin Oncol, v.130, n.1, p.8-14. 2004.

Ozben T. Mechanisms and strategies to overcome multiple drug resistance in cancer. FEBS Lett, v.580, n.12, p.2903-9. 2006.

Pang A., Au W.Y., Kwong Y.L. Caveolin-1 gene is coordinately regulated with the multidrug resistance 1 gene in normal and leukemic bone marrow. Leuk Res, v.28, n.9, p.973-7. 2004.

Paquet V., Zumbuehl A., Carreira E.M. Biologically active amphotericin B-calix[4]arene conjugates. Bioconjug Chem, v.17, n.6, p.1460-3. 2006.

Parri M., Buricchi F., Taddei M.L., Giannoni E., Raugei G., Ramponi G., Chiarugi P. EphrinA1 repulsive response is regulated by an EphA2 tyrosine phosphatase. J Biol Chem, v.280, n.40, p.34008-18. 2005.

Paulsen I.T., Brown M.H., Skurray R.A. Proton-dependent multidrug efflux systems. Microbiol Rev, v.60, n.4, p.575-608. 1996.

Peter M.E., Krammer P.H. The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. Cell Death Differ, v.10, n.1, p.26-35. 2003.

Peterson J., Dwyer J. Nutr. Res., v.18, p. 1995-2018.1998.

Piccoli C., D'aprile A., Scrima R., Ripoli M., Boffoli D., Tabilio A., Capitanio N. Role of reactive oxygen species as signal molecules in the pre-commitment phase of adult stem cells. Ital J Biochem, v.56, n.4, p.295-301. 2007.

Pignatelli B., Friesen M., Walker E.A. IARC Scientific publications Lyon, v.31, p. 95-110. 1980.

Putman M., Van Veen H.W., Konings W.N. Molecular properties of bacterial multidrug transporters. Microbiol Mol Biol Rev, v.64, n.4, p.672-93. 2000.

Quackenbush R.C., Reuther G.W., Miller J.P., Courtney K.D., Pear W.S., Pendergast A.M.. Analysis of the biologic properties of p230 BCR-ABL reveals unique and overlapping properties with the oncogenic p185 and p210 BCR-ABL tyrosine kinases. Blood, v.95, n.9, p.2913-21. 2000.

Quintas-Cardama A., Cortes J. Molecular biology of BCR-ABL1-positive chronic myeloid leukemia. Blood, v.113, n.8, p.1619-30. 2009.

Raugei G., Ramponi G., Chiarugi P. Low molecular weight protein tyrosine phosphatases: small, but smart. Cell Mol Life Sci, v.59, n.6, p.941-9. 2002.

Ren R. Mechanisms of BCR-ABL in the pathogenesis of chronic myelogenous leukaemia. Nat Rev Cancer, v.5, n.3, p.172-83. 2005.

Rigacci S., Rovida E., Dello Sbarba P., Berti A. Low Mr phosphotyrosine protein phosphatase associates and dephosphorylates p125 focal adhesion kinase, interfering with cell motility and spreading. J Biol Chem, v.277, n.44, p.41631-6. 2002.

Rodrigues M.S., Reddy M.M., Sattler M. Cell cycle regulation by oncogenic tyrosine kinases in myeloid neoplasias: from molecular redox mechanisms to health implications. Antioxid Redox Signal, v.10, n.10, p.1813-48. 2008.

Rodriguez J.A., Haun M. Planta Med. v.65, p.522-526. 1999.

Rivlin RS. Riboflavin. In: Ziegler EE, Filer LJ, eds. Present Knowledge in Nutrition. 7th ed. Washington, ILSI Press, p.167-73.1996.

Rumjanek V.M., Trindade G.S., Wagner-Souza K., de-Oliveira M.C., Marques-Santos L.F., Maia R.C., Capella M.A.. Multidrug resistance in tumour cells: characterization of the multidrug resistant cell line K562-Lucena 1. An Acad Bras Cienc, v.73, n.1, p.57-69. 2001.

Sahu S.C., Gray, G.C. Food Chem. Toxicol., v.35, p.443-447. 1997.

Sattler M., Winkler T., Verma S., Byrne C.H., Shrikhande G., Salgia R., Griffin J.D. Hematopoietic growth factors signal through the formation of reactive oxygen species. Blood, v.93, n.9, p.2928-35. 1999.

Sawyers C.L. Chronic myeloid leukemia. N Engl J Med, v.340, n.17, p.1330-40. 1999.

Scaffidi C., Fulda S., Srinivasan A., Friesen C., Li F., Tomaselli K.J., Debatin K.M., Krammer P.H., Peter M.E. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. Embo J, v.17, n.6, p.1675-87. 1998.

Sebti S.M., Hamilton A.D. Design of growth factor antagonists with antiangiogenic and antitumor properties. Oncogene, v.19, n.56, p.6566-73. 2000.

Shah N.K.C., Paquette R. Targeting drug resistant CML ph+- ALL with the spectrum selective protein kinase inhibitor XL228. Blood, p.110. 2007.

Shatz M., Liscovitch M. Caveolin-1 and cancer multidrug resistance: coordinate regulation of pro-survival proteins? Leuk Res, v.28, n.9, p.907-8. 2004.

Shi Q., Chen K., Morris-Natschke S.L., Lee K.H. Recent progress in the development of tubulin inhibitors as antimitotic antitumor agents. Curr Pharm Des, v.4, n.3, p.219-48. 1998.

Skorski T., Kanakaraj P., Nieborowska-Skorska M., Ratajczak M.Z., Wen S.C., Zon G., Gewirtz A.M., Perussia B., Calabrett B. a. Phosphatidylinositol-3 kinase activity

is regulated by BCR/ABL and is required for the growth of Philadelphia chromosome-positive cells. Blood, v.86, n.2, p.726-36. 1995.

Souza A.C., Azoubel S. Queiroz K.C., Peppelenbosch M.P., Ferreira C.V. From immune response to cancer: a spot on the low molecular weight protein tyrosine phosphatase. Cell. Mol. Life Sci.v.66, n.7. p. 1140-53.2009.

Souza-Brito AR.M., Rodriguez J.A, Hiruma-Lima C.A, Haun M., Nunes D.S. Planta Med. v.64, p.126-129. 1998.

Squier M.K., Miller A.C., Malkinson A.M., Cohen J.J. Calpain activation in apoptosis. J Cell Physiol, v.159, n.2, p.229-37. 1994.

Stavrovskaya A.A., Stromskaya T.P. Transport proteins of the ABC family and multidrug resistance of tumor cells. Biochemistry (Mosc), v.73, n.5, p.592-604. 2008.

Suh Y.A., Arnold R.S., Lassegue B., Shi J., Xu X., Sorescu D., Chung A.B., Griendling K.K., Lambeth J.D. Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1. Nature, v.401, n.6748, p.79-82. 1999.

Szakacs G., Paterson J.K., Ludwig J.A., Booth-Genthe C., Gottesman M.M. Targeting multidrug resistance in cancer. Nat Rev Drug Discov, v.5, n.3, p.219-34. 2006.

Tailor P., Gilman J., Williams S., Couture C., Mustelin T. Regulation of the low molecular weight phosphotyrosine phosphatase by phosphorylation at tyrosines 131 and 132. J Biol Chem, v.272, n.9, p.5371-4. 1997.

Talpaz M., Shah N.P., Kantarjian H., Donato N., Nicoll J., Paquette R., Cortes J., O'brien S., Nicaise C., Bleickardt E., Blackwood-Chirchir M.A., Iyer V., Chen T.T., Huang F., Decillis A.P., Sawyers C.L. Desatinibe in imatinibe-resistant philadelfia chromossome-positive. Leukemias, N. Eng J. Med, v.354,n.24,p.2531-41.2006.

Tauchi T., Akahane D, Nunoda K. Activity of a novel Aurora Kinase inhibitor, VE-465, against T315l mutant form of BCR-ABL: In vitro and in vivo studies. Blood, p.108. 2006.

Tautz L., Mustelin T. Strategies for developing protein tyrosine phosphatase inhibitors. Methods, v.42, n.3, p.250-60. 2007.

Thompson M., Williams C.R. Anal. Chim. Acta, v.197, p.375-381. 1976

Tonks N.K. Redox redux: revisiting PTPs and the control of cell signaling. Cell, v.121, n.5, p.667-70. 2005.

Uzunoglu S., Uslu R., Tobu M., Saydam G., Terzioglu E., Buyukkececi F., Omay S.B. Leuk. Res. v.23, p.507-512. 1999.

Van Bambeke F., Balzi E., Tulkens P.M. Antibiotic efflux pumps. Biochem Pharmacol, v.60, n.4, p.457-70. 2000.

Van Den Heuvel-Eibrink M.M., Wiemer E.A., Prins A., Meijerink J., Vossebeld P.J., Van Der Holt B., Pieters R., Sonneveld P. Increased expression of the breast cancer resistance protein (BCRP) in relapsed or refractory acute myeloid leukemia (AML). Leukemia, v.16, n.5, p.833-9. 2002.

Vardiman J.W., Thiele J., Arber D.A., Brunning R.D., Borowitz M.J., Porwit A., Harris N.L., Le Beau M.M., Hellstrom-Lindberg E., Tefferi A., Bloomfield C.D. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. Blood, v.114, n.5, p.937-51. 2009.

Verfaillie C.M. Biology of chronic myelogenous leukemia. Hematol Oncol Clin North Am, v.12, n.1, p.1-29. 1998.

Vivanco I., Sawyers C.L. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. Nat Rev Cancer, v.2, n.7, p.489-501. 2002.

Wall N.R., Mohammad M., Al-Katib A.M. Leuk. Res., v.23, p.881-888. 1999

Wang I.K., Lin-Shiau, Lin, J.K. Eur. J. Cancer, v.35, p.1517-1525. 1999

Warmuth M., Simon N., Mitina O., Mathes R., Fabbro D., Manley P.W., Buchdunger E., Forster K., Moarefi I., Hallek M. Dual-specific Src and Abl kinase inhibitors, PP1 and CGP76030, inhibit growth and survival of cells expressing imatinib mesylate-resistant BCR-ABL kinases. Blood, v.101, n.2, p.664-72. 2003.

Wenzel U., Kuntz S., Brendel M.D.H. Cancer Res., 60: 3823-3831. 2000

Wilkinson J. C., Cepero E., Boise L.H., Duckett C.S. Upstream regulatory role for XIAP in receptor-mediated apoptosis. Mol Cell Biol, v.24, n.16, p.7003-14. 2004.

Wong D.J., Segal E., Chang H.Y. Stemness, cancer and cancer stem cells. Cell Cycle, v.7, n.23, p.3622-4. 2008.

Wood Z.A., Poole L.B., Karplus P.A. Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling. Science, v.300, n.5619, p.650-3. 2003.

Zhang K., Yang E., Tang W., Wong K.P., Mack P. Biochem. Pharmacol., v.54, p.1047-1053. 1997

Zhou H., Wang D.A., Baldini L., Ennis E., Jain R., Carie A., Sebt S.M., Hamilton A.D. Structure-activity studies on a library of potent calix[4]arene-based PDGF antagonists that inhibit PDGF-stimulated PDGFR tyrosine phosphorylation. Org Biomol Chem, v.4, n.12, p.2376-86. 2006.



# PRODUÇÃO CIENTÍFICA NO PERÍODO DE DOUTORAMENTO

## 1. Supervisão de Estágio de Curta Duração

Adriana S. Brito - mestrande do Programa de Pós graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (2008)

## 2. Publicação

1) Brito AS, Arimatéia DS, Souza LR, Lima MA, Santos VO, Medeiros VP, Ferreira PA, Silva RA, Ferreira CV, Justo GZ, Leite EL, Andrade GP, Oliveira FW, Nader HB, Chavante SF. (2008) Anti-inflammatory properties of a heparin-like glycosaminoglycan with reduced anti-coagulant activity isolated from a marine shrimp. *Bioorg Med Chem.*, 16:9588-9595.

## 3. Atividade Docente

Monitoria no Programa de Estágio Docente (PED) na disciplina Bioquímica (BB123) para o curso de Enfermagem no primeiro semestre de 2008. Supervisão: Profa. Dr<sup>a</sup> Eneida de Paula (Departamento de Bioquímica, IB, UNICAMP).

## 4. Participação em Congressos

4.1. Apigenin affects the lipid protein phosphatase activity and expression of pro-inflammatory mediator in leukemic cells. Ferreira, PA., Sousa, RRR., Queiroz, KCS., Ferreira, CV., Aoyama, H. XXXVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), Salvador, Maio de 2007.



4.2. Modulation of protein phosphatases is required for the anti-leukaemic action of morin. Ferreira, P.A., Sousa, RRR., Souza, ACS., Ferreira, CV., Aoyama, H. XXXVII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), Água de Lindóia, Maio de 2008.

4.3. Anticoagulant, antithrombotic and anti-inflammatory properties of a heparin-like compound from shrimp *L.vannamei*. Brito, A.S. Lima, M.A., Souza, L.R., Arimatéia, D.S., Andrade, G.P.V., Cruz, A.K.M., Torri, G., Ferreira, P.A., Silva, R.A., Ferreira, C.V., Nader, H.B, Oliveira, F.W., Chavante, S.F. XXXVII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), Água de Lindóia, Maio de 2008.

4.4. Protein tyrosine phosphatase silencing in combination with vincristine as a strategy to overcome leukemia malignancy. Ferreira, P.A., Ferreira, CV., Aoyama, H. XXXVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), Água de Lindóia, Maio de 2009.

4.5. Calix[6]arene, a Novel Compound Acting as a Strong Inhibitor of the Low Molecular Weight Protein Tyrosine Phosphatase. Anjos, E.F., Ferreira, P.A.; de Fátima, A., Reis, F.S., de Moraes, F.R., Neshich, G., Milani, R., Aoyama, H., Ferreira, CV. XXXIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), Foz do Iguaçu, Maio de 2010.

4.6. Calix[6]arene Induces Resistant Erythroblastic Leukemia Cells Death Via Positive Modulation of Protein Tyrosine Phosphatase PTEN. Ferreira, P.A., de Fátima, A., Reis, F.S., Sousa, R.R.R., Soraggi, C.L., Peppelenbosch, M.P., Ferreira, CV. XXXIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), Foz do Iguaçu, Maio de 2010.

## 5. Prêmio Recebido

Prêmio de melhor pôster da SBBq, 2010 (Resultados referentes ao capítulo 1 da tese)

Calix[6]arene Induces Resistant Erythroblastic Leukemia Cells Death Via Positive Modulation of Protein Tyrosine Phosphatase PTEN. Ferreira, P.A., de Fátima, A., Reis, F.S., Sousa, R.R.R., Soraggi, C.L., Peppelenbosch, M.P., Ferreira, CV. XXXIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), Foz do Iguaçu, Maio de 2010.

Em 29 de Junho, foi consignado em ata votos de congratulações pela premiação recebida pelo conselho Universitário da Unicamp, através de suas câmaras de Administração e de Ensino, Pesquisa e Extensão.